

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BIOQUÍMICA

**EFEITO *IN VITRO* DOS ÁCIDOS ETILMALÔNICO E METILSUCÍNICO SOBRE AS
ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA
MITOCONDRIAL E DA CREATINA QUINASE EM CÓRTEX CEREBRAL, MÚSCULO
ESQUELÉTICO E MÚSCULO CARDÍACO DE RATOS JOVENS**

Dissertação de Mestrado

ALETHÉA GATTO BARSCHAK

Orientador: Prof. Dr. Moacir Wajner

**Porto Alegre
2003**

Dedico este trabalho a meus pais Nelson e Zulmira que sempre apoiaram minhas decisões e me ajudaram a atingir meus objetivos e ao Válder pelo amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Moacir, pelo seu carinho, compreensão, dedicação e, principalmente, pela sua paciência.

Aos bolsistas: Karina Dalcin, Karina Scussiato, Rita, Vanessa e Ana Rúbia pelo apoio e amizade.

À Patrícia, ao Guilhian e ao César pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho e pela sua amizade.

Aos colegas de pós-graduação do Lab.38: Rafael, Letícia, Dênis, Vilson, Alexandra e Cleide pelas dicas e pelo companheirismo.

À Vânia pela sua amizade e por tudo que passamos juntas.

Aos colegas dos laboratórios 34 e 36, pois estavam sempre dispostos a ajudar.

À Carmen Vargas pelo apoio, incentivo e amizade desde os tempos de bolsista de iniciação.

Aos amigos da Genética do Hospital de Clínicas, principalmente ao pessoal do HPLC: Lisana, Marina, Gislane, Marion e Gustavo pela amizade.

Aos colegas do Hospital de Alvorada que sempre me apoiaram.

Aos meus pais Nelson e Zulmira pelo amor, compreensão e apoio.

Ao meu irmão Diego pela ajuda quando precisei.

Ao Válter pelo amor, dedicação e paciência.

Índice

Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Erros inatos do metabolismo.....	1
<i>1.1.1 Conceito e classificação dos erros inatos do metabolismo</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2 Sintomatologia.....</i>	<i>2</i>
<i>1.1.3 Diagnóstico de erros inatos do metabolismo.....</i>	<i>3</i>
1.2 Acidúrias orgânicas.....	6
<i>1.2.1 Sintomatologia.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.2 Diagnóstico</i>	<i>8</i>
1.3 Defeitos no metabolismo de ácidos graxos	13
<i>1.3.1 Produção de energia a partir de ácidos graxos</i>	<i>16</i>
<i>1.3.2 β-Oxidação de ácidos graxos</i>	<i>17</i>
1.4 Deficiência de desidrogenase para acil-CoA de cadeia curta (SCAD).....	22
<i>1.4.1 Achados laboratoriais na deficiência de SCAD</i>	<i>23</i>
<i>1.4.2 Patogênese</i>	<i>23</i>
<i>1.4.3 Metabólitos acumulados na deficiência de SCAD</i>	<i>24</i>
<i>1.4.4 Aspectos moleculares da deficiência de SCAD.....</i>	<i>25</i>
<i>1.4.5 Outros distúrbios com acidúria etilmalônica</i>	<i>25</i>
1.5 Metabolismo energético cerebral	27
<i>1.5.1 Creatina quinase</i>	<i>28</i>
<i>1.5.2 Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa</i>	<i>31</i>
<i>1.5.2.1 NADH desidrogenase (Complexo I).....</i>	<i>32</i>
<i>1.5.2.2 Coenzima Q</i>	<i>32</i>
<i>1.5.2.3 Complexo II e Succinato desidrogenase</i>	<i>32</i>

1.5.2.4 Complexo b-c ₁ (Complexo III) e citocromo c	33
1.5.2.5 Citocromo oxidase (Complexo IV).....	34
1.5.2.6 Bombas de prótons	34
1.5.2.7 Transferência seqüencial de elétrons	35
2. OBJETIVOS.....	37
2.1 Gerais	37
2.2 Específicos	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Equipamentos.....	39
3.2 Reagentes utilizados para a determinação das atividades dos complexos da cadeia respiratória	40
3.3 Reagentes utilizados para a determinação da atividade da creatina quinase	41
3.4 Caracterização da amostra.....	41
3.5 Determinação da atividade da creatina quinase.....	42
3.5.1 Soluções	42
3.5.2 Preparação de tecidos para a medida das atividades da creatina quinase.....	43
3.5.2.1 <i>Córtex cerebral, músculo esquelético e cardíaco de ratos</i>	43
3.5.2.2 <i>Preparação das frações mitocondrial e citosólica de córtex cerebral de ratos</i>	43
3.5.3 Medida da atividade da creatina quinase.....	44
3.6 Determinação das atividades dos complexos da cadeia respiratória.....	45
3.6.1 Soluções.....	45
3.6.1.1 <i>Soluções para preparação da amostra.....</i>	45
3.6.1.2 <i>Soluções para a determinação da atividade do Complexo I+CoQ+III.....</i>	45
3.6.1.3 <i>Soluções para a determinação da atividade do Complexo II e SDH.....</i>	46
3.6.1.4 <i>Soluções para a determinação da atividade do Complexo II+CoQ+III.....</i>	46
3.6.1.5 <i>Soluções para a determinação da atividade do Complexo III.....</i>	47
3.6.1.6 <i>Soluções para a determinação da atividade do Complexo IV.....</i>	48
3.6.2 Preparação dos tecidos para a medida das atividades dos complexos da cadeia respiratória.....	49

3.6.3 Medida das atividades dos complexos da cadeia respiratória.....	49
3.6.3.1 <i>Determinação da atividade do Complexo I + COQ + III (NADH: citocromo c oxirredutase).....</i>	49
3.6.3.2 <i>Determinação da atividade do Complexo II (succinato:DCIP oxirredutase).....</i>	50
3.6.3.3 <i>Determinação da atividade da SDH (succinato:fenazina oxirredutase).....</i>	50
3.6.3.4 <i>Determinação da atividade do Complexo II+CoQ+III (succinato: citocromo c oxirredutase).....</i>	51
3.6.3.5 <i>Determinação da atividade do Complexo III (ubiquinol:citocromo c oxirredutase).....</i>	51
3.6.3.6 <i>Determinação da atividade do Complexo IV (citocromo c oxidase).....</i>	51
3.7 Análise estatística.....	52
4. RESULTADOS.....	53
4.1 Efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos.....	53
4.1.1 Complexo I+III.....	53
4.1.2 Succinato desidrogenase - SDH.....	54
4.1.3 Complexo II.....	56
4.1.4 Complexo II+III.....	57
4.1.5 Complexo III.....	59
4.1.6 Complexo IV.....	60
4.2 Efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em músculo esquelético de ratos.....	62
4.2.1 Complexo I+III.....	62
4.2.2 Succinato desidrogenase - SDH.....	63
4.2.3 Complexo II.....	65
4.2.4 Complexo II+III.....	66
4.2.5 Complexo III.....	68
4.2.6 Complexo IV.....	69
4.3 Efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em músculo cardíaco de ratos.....	71
4.3.1 Complexo I+III.....	71

4.3.2	<i>Sucinato desidrogenase - SDH</i>	72
4.3.3	Complexo II	74
4.3.4	Complexo II+III	76
4.3.5	Complexo III	77
4.3.6	Complexo IV	79
4.4	Efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade da creatina quinase em córtex cerebral de ratos	81
4.5	Efeito do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase em córtex cerebral de ratos na presença de antioxidantes	82
4.6	Efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade da creatina quinase em músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos....	84
4.7	Efeito do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de córtex cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos	87
4.8	Efeito do ácido etilmalônico sobre a atividade da fração mitocondrial da creatina quinase de córtex cerebral de ratos na presença de antioxidantes	89
4.9	Efeito do ácido etilmalônico sobre a atividade da fração citosólica da creatina quinase de córtex cerebral, músculo cardíaco e músculo esquelético de ratos	90
5.	DISCUSSÃO	92
6.	CONCLUSÕES	100
7.	PERSPECTIVAS	102
8.	BIBLIOGRAFIA	103

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Protocolo para o diagnóstico laboratorial das acidúrias orgânicas em recém-nascidos e neonatos em crise.....	9
Figura 1.2 - Ciclo da Carnitina.....	18
Figura 1.3 - Espiral da β -oxidação mitocondrial.	19
Figura 1.4 - Formação dos metabólitos na deficiência de SCAD a partir do metabolismo alternativo do n-butilil-CoA	24
Figura 1.5 - Fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória.....	36
Figura 4.1 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo I+III em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.....	53
Figura 4.2 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo I+III em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.....	54
Figura 4.3 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade da SDH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.....	55
Figura 4.4 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade da SDH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.....	55
Figura 4.5 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo II em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.....	56
Figura 4.6 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo II em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.....	57
Figura 4.7 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo II+III em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.....	58

Figura 4.8 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo II+III em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.....	58
Figura 4.9 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo III em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.....	59
Figura 4.10 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo III em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.....	60
Figura 4.11 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo IV em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.....	61
Figura 4.12 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo IV em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.....	61
Figura 4.13 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo I+III em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.....	62
Figura 4.14 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo I+III em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.....	63
Figura 4.15 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade da SDH em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.....	64
Figura 4.16 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade da SDH em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.....	64
Figura 4.17 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo II em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.....	65
Figura 4.18 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo II em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.....	66
Figura 4.19 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo II+III em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.....	67

Figura 4.20 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo II+III em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.....	67
Figura 4.21 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo III em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.....	68
Figura 4.22 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo III em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.....	69
Figura 4.23 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo IV em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.....	70
Figura 4.24 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo IV em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.....	70
Figura 4.25 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo I+III em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.....	71
Figura 4.26 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo I+III em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.....	72
Figura 4.27 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade da SDH em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.....	73
Figura 4.28 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade da SDH em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.....	73
Figura 4.29 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo II em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.....	74
Figura 4.30 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo II em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.....	75
Figura 4.31 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo II+III em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.....	76

Figura 4.32 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo II+III em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.....	76
Figura 4.33 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo III em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.....	77
Figura 4.34 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo III em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.....	78
Figura 4.35 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo IV em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.....	79
Figura 4.36 – Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo IV em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.....	80
Figura 4.37 - Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de córtex de ratos.....	81
Figura 4.38 - Efeito <i>in vitro</i> do ácido metilsucínico sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de córtex de ratos.....	82
Figura 4.39 - Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico (EMA) sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos em presença ou ausência da glutatona (GSH) e do L-NAME.....	83
Figura 4.40 - Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico (EMA) sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos em presença ou ausência do α -tocoferol (TROLOX) e do ácido ascórbico.....	83
Figura 4.41 - Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico (A) e do ácido metilsucínico (B) sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.....	85

Figura 4.42 - Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico (A) e do ácido metilsucínico (B) sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.....	86
Figura 4.43 - Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico e do ácido metilsucínico sobre a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de homogeneizado de córtex (A), músculo cardíaco (B) e músculo esquelético (C) de ratos.....	88
Figura 4.44 - Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico (EMA) sobre a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de homogeneizado de córtex cerebral de ratos em presença ou ausência da glutatona (GSH), do L-NAME, α -tocoferol (Vit. E) e do ácido ascórbico (Vit. C).....	90
Figura 4.45 - Efeito <i>in vitro</i> do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase na fração citosólica de homogeneizado de córtex (A), músculo cardíaco (B) e músculo esquelético (C) de ratos.....	91

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Principais manifestações clínicas dos erros inatos do metabolismo nos primeiros anos de vida	3
Tabela 1.2 – Testes de triagem na urina para erros inatos do metabolismo.....	4
Tabela 1.3 - Principais sintomas neurológicos dos pacientes afetados por acidúrias orgânicas.....	8
Tabela 1.4 - Indicações para a determinação de ácidos orgânicos na urina.....	10
Tabela 1.5 - Principais acidemias orgânicas diagnosticadas pelo aumento dos níveis urinários de ácidos orgânicos.....	12
Tabela 1.6 - Apresentação clínica dos defeitos de oxidação dos ácidos graxos .	15

Lista de Abreviaturas

AE	aciduria etilmalônica
CK	creatina quinase
CK _{mi}	creatina quinase mitocondrial
CoA	coenzima A
COX	citocromo oxidase
CPT	carnitina aciltransferase
EIM	erros inatos do metabolismo
CG	cromatografia gasosa
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
LCAD	desidrogenase da acil-CoA de cadeia longa
LCHAD	desidrogenase da 3-hidroxiacil-CoA de cadeia longa
MCAD	desidrogenase da acil-CoA de cadeia média
MS/MS	espetrometria de massa em Tandem
PCr	fosfocreatina
Pi	fosfato
SCAD	desidrogenase da acil-CoA de cadeia curta
SCHAD	desidrogenase da 3-hidroxiacil-CoA de cadeia curta
SDH	sucinato desidrogenase solúvel
SNC	sistema nervoso central
VLCAD	desidrogenase da acil-CoA de cadeia muito longa

RESUMO

A deficiência de desidrogenase das acil-CoA de cadeia curta (SCAD) é um erro inato do metabolismo devido a um defeito no último ciclo de β -oxidação, sendo específica para ácidos graxos de cadeia curta (4 a 6 carbonos), resultando no acúmulo de ácidos orgânicos de cadeia curta, principalmente dos ácidos etilmalônico e metilsucínico, formados pela metabolização por rotas secundárias do butiril-CoA acumulado.

A deficiência de SCAD manifesta-se principalmente no período neonatal ou durante a infância e até mesmo na idade adulta. Os achados clínico-laboratoriais são heterogêneos, incluindo acidose metabólica, acidose láctica, vômitos, atraso no desenvolvimento, convulsões, fraqueza muscular e miopatia crônica. No entanto, o sintoma mais comum apresentado pelos pacientes portadores dessa deficiência é a disfunção neurológica, a qual pode estar relacionada ao acúmulo de ácidos orgânicos de cadeia curta e sua toxicidade ao sistema nervoso central.

No presente trabalho nosso objetivo foi investigar o efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre algumas atividades enzimáticas fundamentais para o metabolismo energético. Visando contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatogenia dessa doença testamos o efeito desses metabólitos sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória e da creatina quinase em córtex cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos jovens.

Verificamos que os ácidos etilmalônico e metilsucínico, na concentração de 1 mM, inibiram significativamente a atividade do complexo I+III da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos, porém não alteraram a atividade dos demais complexos da cadeia respiratória (II, SDH, II+III, III e IV) nesses tecido bem como não alteraram a atividade de todos os complexos da cadeia respiratória em músculo esquelético e músculo cardíaco dos ratos nas concentrações de 1 e 5 mM. Observamos também que o ácido etilmalônico (1 e 2,5 mM) reduziu de forma significativa a atividade total de creatina quinase em córtex cerebral de ratos, mas não alterou essa atividade nos músculos esquelético e cardíaco. Por outro lado o ácido metilsucínico não modificou a

atividade total da creatina quinase em nenhum dos três tecidos estudados, córtex cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos.

Testamos então o efeito do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase nas frações mitocondrial e citosólica de córtex cerebral, músculo cardíaco e músculo esquelético de ratos. O ácido (1 e 2,5 mM) inibiu significativamente a atividade da creatina quinase apenas na fração mitocondrial de córtex cerebral.

Demostramos também que o antioxidante glutatona (1 mM) preveniu o efeito inibitório do ácido etilmalônico sobre a atividade total da creatina quinase em córtex cerebral. A glutatona (0,5 mM) e o ácido ascórbico (0,5 mM) também preveniram o efeito inibitório do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de córtex cerebral. Por outro lado a adição de L-NAME ou trolox não alterou o efeito inibitório do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase.

Esses resultados indicam que o ácido etilmalônico possui um efeito inibitório específico sobre a isoforma mitocondrial da creatina quinase do cérebro, ou seja, sobre a CK_{mi}, não afetando a isoenzima citosólica cerebral ou as isoenzimas citosólicas e mitocondrial presentes no músculo esquelético e no músculo cardíaco. Além disso, o efeito da glutatona, que atua como um agente redutor de grupos tióis, indica que a ação inibitória do ácido etilmalônico sobre a creatina quinase pode estar relacionada à oxidação de grupos sulfidrila essenciais à atividade da enzima. Já a prevenção do efeito inibitório do ácido etilmalônico causada pelo ácido ascórbico sugere que o ácido pode estar envolvido com a formação dos radicais superóxido e hidroxila, uma vez que este agente antioxidante atua sobre esses radicais livres.

Essas observações em seu conjunto indicam que os ácidos etilmalônico e metilsucínico comprometem o metabolismo energético cerebral através da inibição de atividades enzimáticas essenciais para a produção e transporte de energia pela célula. É, portanto, possível que esse possa ser um dos mecanismos envolvidos com o dano cerebral que ocorre nos pacientes afetados por deficiência de SCAD.

ABSTRACT

Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency is an inherited metabolic disease caused a defect in the last cycle of β -oxidation, resulting in the accumulation of short chain fatty acids, mainly of ethylmalonic and methylsuccinic acids, formed from butyryl-CoA.

SCAD deficiency usually appears in the neonatal period, but the main symptoms may appear during childhood or even in the adult. The symptomatology is highly heterogeneous, including metabolic acidosis, lactic acidemia, vomiting, development delay, seizures, muscular weakness and chronic myopathy. However, the most common symptomatology is neurological dysfunction, which may be related to the accumulation of neurotoxic short chain organic acids.

In the present work our objective was to investigate the *in vitro* effect of ethylmalonic and methylsuccinic acids on some important enzymatic activities of energy metabolism aiming to contribute to a better understanding of the pathophysiology of SCAD deficiency. We tested the effect of these metabolites on the activity of the complexes of the respiratory chain and the creatine kinase in cerebral cortex, skeletal muscle and cardiac muscle of young rats

We verified that ethylmalonic and methylsuccinic acids, at the concentration of 1 mM, significantly inhibited the activity of complex I+III of the respiratory chain in cerebral cortex of rats. However, these acids did not affect the activity of the other complexes of the respiratory chain (II, SDH, II+III, III and IV) in cerebral cortex, neither the activity of all complexes of the respiratory chain in skeletal muscle and cardiac muscle of rats at 1 and 5 mM concentrations.

We also observed that ethylmalonic acid (1 and 2.5 mM) significantly reduced the activity of total creatine kinase in cerebral cortex of rats, but did not modify this activity in skeletal and cardiac muscle. On the other hand methylsuccinic acid did not modify the activity of total creatine kinase in cerebral cortex, skeletal muscle and cardiac muscle of rats.

We then tested the effect of ethylmalonic acid on the activity of creatine kinase in mitochondrial and cytosolic fractions of cerebral cortex, cardiac muscle and skeletal

muscle of rats. The acid (1 and 2.5 mM) significantly inhibited the activity of the creatine kinase in the mitochondrial fraction of cerebral cortex, without affecting this activity in the cytosolic or both fractions in skeletal and cardiac muscle.

We also demonstrated that the antioxidant agent glutathione (1 mM) prevented the inhibitory effect of ethylmalonic acid on the activity of total creatine kinase in cerebral cortex. Furthermore, glutathione and ascorbic acid (0.5 mM) prevented the inhibitory effect of the ethylmalonic acid on the activity of the creatine kinase in the mitochondrial fraction of cerebral cortex. In contrast, the addition of L-NAME or trolox (soluble vitamin E) did not modify the inhibitory effect of the ethylmalonic acid on creatine kinase activity.

These results indicate that the ethylmalonic acid has a specific inhibitory effect on the mitochondrial isoform of creatine kinase in the brain, that is, on CK_{mi}, not affecting the cytosolic isoenzyme or the cytosolic and mitochondrial isoenzymes of skeletal and cardiac muscles. Moreover, the effect of glutathione, that acts as a thiol-reducing agent, indicates that the inhibitory action of ethylmalonic acid on the creatine kinase may be related to the oxidation of essential sulfhydryl groups of the enzyme. The prevention of the inhibitory effect of ethylmalonic acid caused by ascorbic acid suggests that the acid can be involved with the formation of the free radicals superoxide and hydroxyl, which are trapped by this antioxidant agent.

Taken together, these results indicate that ethylmalonic and methysuccinic acids compromise cerebral energy metabolism through the inhibition of essential enzymatic activities necessary for the production and transport of energy in the cell. It is, therefore, possible that this may be one of the mechanisms involved with the cerebral damage that occurs in patients affected for SCAD deficiency.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Erros inatos do metabolismo

1.1.1 Conceito e classificação dos erros inatos do metabolismo

Erros inatos do metabolismo (EIM) são defeitos hereditários que ocorrem em rotas metabólicas quase sempre devidos a anormalidades na síntese de uma proteína, geralmente uma enzima, alterando suas funções. A ausência ou deficiência severa da atividade enzimática leva a um bloqueio metabólico com acúmulo dos substratos e seus derivados, com repercussão clínica variável no indivíduo, dependendo da importância da rota afetada. No entanto, geralmente provocam sintomatologia grave, muitas vezes afetando o sistema nervoso central (SNC). Os EIM já foram descritos em todas as áreas do metabolismo humano normal (Scriver et al, 2001).

Sinclair (1982) classificou os EIM em quatro grandes grupos conforme o tipo de função exercida pela proteína deficiente e o tecido envolvido, considerando ainda aspectos clínicos, bioquímicos, patológicos e terapêuticos:

- desordens de transporte: afetam o transporte renal ou intestinal de moléculas orgânicas ou inorgânicas. Exemplos: deficiência de dissacaridases e defeito no transporte de magnésio;
- desordens de armazenamento, degradação e secreção: envolvem proteínas relacionadas com o aparelho de Golgi ou lisossomas, na sua grande maioria, provocando acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos. Exemplos: doenças lisossômicas de depósito, glicogenoses e cistinose;
- desordens de síntese: envolvem a síntese anormal ou incompleta de proteínas com funções hormonais, de defesa imunológica, estruturais, etc. Exemplo: hiperplasia

adrenal congênita por deficiência na atividade da enzima de 21-hidroxilase, hipogamaglobulinemia;

- desordens do metabolismo intermediário: envolvem deficiências enzimáticas das rotas de metabolização de moléculas pequenas (aminoácidos, glicídios, neurotransmissores, etc), podendo comprometer rotas importantes como os ciclos dos ácidos tricarboxílicos e da uréia, ou rotas relacionadas a estas. O bloqueio produz o acúmulo do substrato da enzima deficiente, bem como dos metabólitos produzidos a partir deste, além da deficiência do produto final da rota, caso não possa ser suprido por outra via metabólica. O acúmulo de metabólitos tóxicos pode causar outras alterações bioquímicas secundárias e danos nos tecidos. Como esses produtos são liberados na circulação, podem prejudicar outros tecidos, sendo finalmente excretados na urina. Constituem o maior grupo do EIM e têm como exemplos as acidúrias orgânicas, as aminoacidopatias, as desordens do metabolismo das purinas, da frutose, galactose e pentose, e outros.

1.1.2 Sintomatologia

As manifestações clínicas dos EIM são muito variadas e inespecíficas, inclusive entre pacientes que possuem o mesmo distúrbio, pois a expressividade é muito variável. Essa variação fenotípica deve-se a diferentes graus de deficiência enzimática, área do metabolismo envolvida e tecidos afetados. Algumas manifestações clínicas aparecem com maior freqüência no período neonatal, tais como deficiência no crescimento, vômitos, diarreia, convulsões, letargia ou coma, odor peculiar na pele ou urina e dificuldade alimentar, enquanto outras (atraso no desenvolvimento psicomotor, neurodegeneração progressiva) podem aparecer mais tarde (Burton, 1987). A tabela

1.1 apresenta as manifestações clínicas mais freqüentes dos erros inatos do metabolismo.

Tabela 1.1 - Principais manifestações clínicas dos erros inatos do metabolismo nos primeiros anos de vida (Burton, 1987)

- Deficiência de crescimento
- Dificuldade alimentar
- Vômitos
- Diarréia
- Letargia
- Coma
- Hipotonia ou hipertonicidade
- Convulsões
- Dificuldade respiratória e apnéia
- Hepatomegalia
- Odor anormal na urina e na pele
- Anormalidades oculares
- Dismorfias (anormalidades menores)

1.1.3 Diagnóstico de erros inatos do metabolismo

Para simplificar a investigação dos EIM, podemos dividi-los em dois grandes grupos, o das moléculas pequenas (aminoacidopatias, acidemias orgânicas,

intolerância a açúcares, etc.) e o das moléculas complexas (doenças lisossômicas de depósito, peroxissomais, etc.).

O protocolo para a investigação laboratorial inicial é dirigido principalmente para o diagnóstico dos EIM de moléculas pequenas e é denominada de triagem simples. A triagem simples contempla uma bateria de testes urinários, bem como cromatografia semiquantitativa de aminoácidos em sangue e urina. A tabela 1.2 mostra os principais testes de triagem urinários. Em sua maioria, os testes de triagem não são específicos, mas o resultado positivo indica a necessidade de avaliações mais específicas, direcionando a investigação para exames mais dirigidos.

Tabela 1.2 – Testes de triagem na urina para erros inatos do metabolismo

<i>Teste</i>	<i>Metabólito detectado</i>	<i>EIM</i>
Benedict (Cliniteste)	Açúcares redutores	Galactosemia, intolerância à frutose, glicosúria renal
Dinitrofenilhidrazina	α -cetoácidos	Acidúrias orgânicas
p-Nitroanilina	Ácido metilmalônico	Acidúria metilmalônica
Cianeto-nitroprussiato	Cistina/homocistina	Cistinúria/homocistinúria
Nitrosonaftol	Tirosina e derivados da tirosina	Tirosinemia
Teste do Sulfito	Sulfitos	Def. de sulfito oxidase, Deficiência do cofator Molibdênio
Cloreto férrico	Cetoácidos	Fenilcetonúria

Assim, o resultado positivo no teste de Benedict indica a presença de um açúcar redutor e nos direciona para a identificação do composto acumulado, o que pode ser realizado por cromatografia em camada delgada de glicídios na urina. A presença de

galactose neste último teste, pode indicar uma galactosemia, enquanto a presença de frutose sugere intolerância hereditária à frutose e a glicose indica glicosúria renal ou síndrome de Fanconi de causa primária ou secundária. Para a definição do tipo de galactosemia, devem ser medidas as enzimas possivelmente deficientes, como a galactose-1-fosfato uridil transferase, cuja baixa atividade está relacionada à galactosemia clássica. Os testes dinitrofenilhidrazina e p-nitroanilina, quando positivos, direcionam a investigação para as acidúrias orgânicas. Nestes casos, a realização de uma cromatografia gasosa de ácidos orgânicos é indicada. No caso da p-nitroanilina, um resultado positivo indica fortemente a possibilidade de acidúria metilmalônica. Já o teste para a detecção de sulfitos aponta para a possibilidade da deficiência de sulfito oxidase e do metabolismo do cofator molibdênio. O teste do cianeto-nitroprussiato indica a presença de grupamentos sulfidril que são característicos da cistinúria e homocistinúria (com nitrato de prata) e o do nitrosonaftol, por detectar a presença de metabólitos da tirosina, indica o diagnóstico da tirosinemia. Já o teste do cloreto férrico indica a presença de cetoácidos (fenilcetonúria). Esses testes devem ser realizados simultaneamente com a cromatografia de aminoácidos.

A cromatografia de aminoácidos pode ser realizada em camada delgada ou em papel. É um teste semiquantitativo, pois somente observamos a presença de bandas aumentadas indicando que aquele aminoácido está em quantidade acima do normal (Ersser & Smith, 1976). Quando observamos que o aminoácido está em concentração mais elevada, é aconselhável realizar uma dosagem quantitativa do mesmo para se verificar o valor exato da concentração do aminoácido, o que pode ser feito por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (Joseph & Marsden, 1986), cromatografia de troca iônica (analisador automático de aminoácidos).

A identificação de um EIM permite, muitas vezes, a introdução de um tratamento eficaz. Quando isso não é possível, a ocorrência de outros afetados no mesmo grupo familiar pode ser evitada pela identificação de casais em risco, aos quais pode ser oferecido o aconselhamento genético e, em muitos casos, o diagnóstico pré-natal (Golpertz, 1974; Warrs et al, 1975).

1.2 Acidúrias orgânicas

Acidúrias orgânicas são doenças hereditárias autossômicas recessivas em que ocorre acúmulo tecidual de um ou mais ácidos carboxílicos (Chalmers & Lawson, 1982; Scriver et al, 2001). São causadas por bloqueio metabólico devido à deficiência severa da atividade de uma enzima, usualmente do metabolismo dos aminoácidos, podendo também comprometer o metabolismo dos lipídios ou dos carboidratos. Há mais de 60 destes distúrbios cuja etiologia está bem definida.

Em uma visão mais ampla, os defeitos de oxidação de ácidos graxos, constituído por 23 defeitos bioquímicos e caracterizados bioquimicamente pelo acúmulo de ácidos dicarboxílicos de cadeia média de carbonos (ácidos adípico, subérico e sebácico), bem como de vários ácidos carboxílicos específicos para cada doença, também podem ser considerados como acidúrias orgânicas (Roe & Coates, 1995; Rinaldo et al, 1998).

Relativamente a outros grupos de EIM, as acidemias orgânicas são consideradas as mais freqüentes doenças metabólicas em crianças severamente enfermas (Chalmers et al, 1980; Hoffmann, 1996) e dos mais freqüentes grupos de enfermidades hereditárias do metabolismo (Hoffmann, 1994).

1.2.1 Sintomatologia

Embora as manifestações clínicas dos distúrbios do metabolismo dos ácidos orgânicos sejam bastante variáveis, podendo refletir disfunções em praticamente todos os sistemas do organismo, a maioria dos afetados apresenta disfunção neurológica em suas variadas manifestações (Tabela 1.3). Por outro lado, aproximadamente 20 % dos portadores dessas doenças apresentam sintomas exclusivamente neurológicos (Rashed et al, 1994).

Algumas destas doenças tem um início de apresentação súbito no período neonatal. Os afetados apresentam sintomas graves que muitas vezes os levam ao desenlace fatal e são freqüentemente confundidos com septicemia, visto que ambas situações se caracterizam por acidose e encefalopatia aguda. Em crianças de mais idade, a apresentação do quadro clínico é mais variável, porém as manifestações neurológicas são bastante freqüentes, quando não as únicas. Nestes pacientes, podemos ter a forma crônica progressiva que se caracteriza por atraso no desenvolvimento físico/psicomotor, recusa alimentar, vômitos, infecções de repetição, hipotonia e outros sinais neurológicos e a forma crônica intermitente, com episódios recorrentes de cetoacidose, letargia, coma e outros sinais neurológicos, que podem vir acompanhados de sintomas em outros órgãos, principalmente no fígado (Síndrome de Reye).

Tabela 1.3 - Principais sintomas neurológicos dos pacientes afetados por acidúrias orgânicas

- Retardo psicomotor progressivo
 - Hipotonia
 - Convulsões
 - Crises encefalopáticas (ataques com coma e convulsões generalizadas)
 - Ataxia
 - Sinais extrapiramidais (distonia, atetose, discinesia. etc.)
 - Sinais piramidais (paralisia cerebral)
 - Mioclônus
 - Macrocefalia/microcefalia
 - Paresia e hemiplegia
-

1.2.2 Diagnóstico

O diagnóstico das acidemias orgânicas é fundamentalmente laboratorial e usualmente feito por um aumento significativo na concentração urinária de vários ácidos orgânicos. O diagnóstico das acidemias orgânicas é feito em urina, pois os ácidos orgânicos possuem uma depuração renal elevada provavelmente devido à sua alta toxicidade. A figura 1.1 mostra alguns passos para o diagnóstico de acidemias orgânicas.

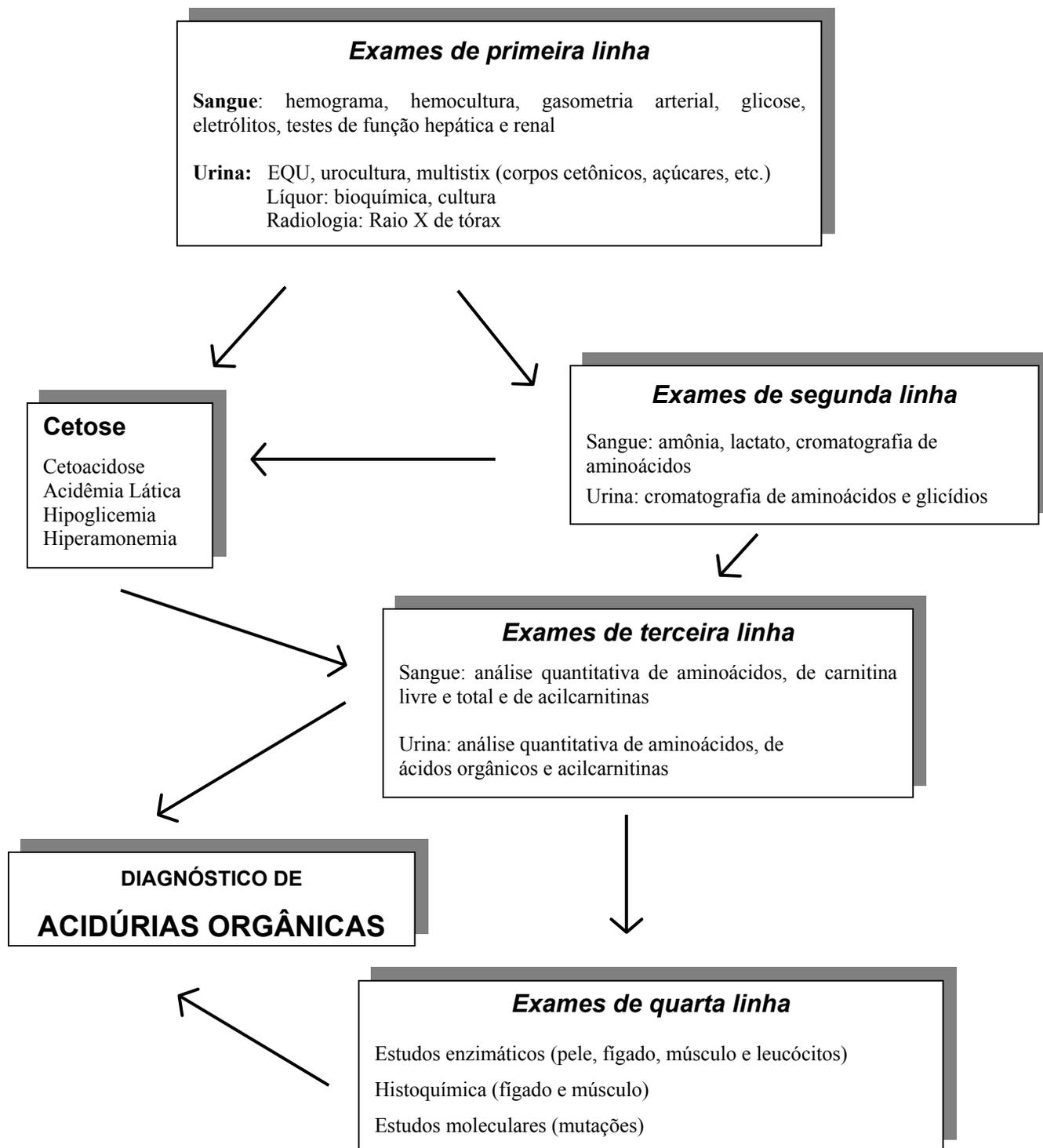


Figura 1.1 - Protocolo para o diagnóstico laboratorial das acidúrias orgânicas em recém-nascidos e neonatos em crise.

A tabela 1.4 mostra as principais indicações para a análise de ácidos orgânicos.

Tabela 1.4 - Indicações para a determinação de ácidos orgânicos na urina

-
- Crise metabólica de causa desconhecida (acidose metabólica, acidemia láctica, aumento do ânion gap, hipoglicemia, cetonemia, cetonúria neonatal, hiperamonemia, citopenia)
 - Manifestações clínicas de intoxicação sistêmica
 - Acidose metabólica persistente
 - Hepatopatia de causa desconhecida
 - Doença neurológica de causa desconhecida
 - Encefalopatia com convulsões
 - Doença multisistêmica com sintomas progressivos
 - Distúrbio de metabolismo energético suspeito
-

O desenvolvimento da cromatografia gasosa aplicada para a detecção de ácidos orgânicos em líquidos biológicos possibilitou a partir da segunda metade da década de 60 o diagnóstico acurado das acidemias orgânicas e a detecção de um número crescente de novos distúrbios (Tanaka et al, 1996; Buchanan & Thoene, 1991). A análise de ácidos orgânicos é feita por cromatografia gasosa (CG) em colunas capilares longas ou de preferência por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) usualmente em uma amostra de urina, preferencialmente nos momentos de crise com descompensação metabólica (Sweetmann, 1995).

O diagnóstico correto de uma acidúria orgânica depende da identificação na urina de vários ácidos orgânicos específicos. A verificação de apenas um metabólito elevado geralmente não é muito elucidativa no diagnóstico destes distúrbios, uma vez que indica a possibilidade de vários distúrbios. Muitas vezes um diagnóstico é somente

conseguido através de análise repetitiva de amostras coletadas em períodos distintos e especialmente durante crises com descompensação metabólica, quando as concentrações dos metabólitos anormais aumentam. A tabela 1.5 mostra as principais acidemias orgânicas diagnosticadas pelo aumento dos níveis urinários de vários ácidos orgânicos. Para o caso dos defeitos de oxidação de ácidos graxos que constituem um grupo separado de acidemias, visto que os pacientes apresentam com frequência acidose metabólica, deve-se identificar os ácidos dicarboxílicos característicos na urina através de CG/EM bem como dos níveis séricos e teciduais de carnitina total e livre e o perfil das acilcarnitinas no sangue. Estudos sobre a oxidação de ácidos graxos e a determinação das atividades enzimáticas específicas são igualmente úteis para estabelecer-se o diagnóstico final.

Tabela 1.5 - Principais acidemias orgânicas diagnosticadas pelo aumento dos níveis urinários de ácidos orgânicos.

DOENÇA	ÁCIDOS ORGÂNICOS AUMENTADOS NA URINA
Acidemia Propiônica	Ácido 3-hidroxipropiônico, ácido metilcítrico, ácido 3-hidroxiivalérico, propionilglicina
Acidemia Metilmalônica	Ácido metilmalônico e metabólitos da acidemia propiônica
Acidemia Láctica	Ácido láctico, ácido pirúvico, ácido 2-hidroxiбутírico, ácido 4-hidroxiifenilático
Acidemia Isovalérica	Isovalerilglicina, ácido 3-hidroxiisovalérico, ácido 4-hidroxiisovalérico
Deficiência múltipla de Carboxilases Deficiência da Holocarboxilase Sintetase e Deficiência de Biotinidase	Ácido 3-hidroxiisovalérico, 3-metilcrotonilglicina, ácido metilcítrico, ácido 3-hidroxiopropiônico, ácido láctico
Deficiência de 3-metilcrotonil-CoA Carboxilase	Ácido 3-hidroxiisovalérico, 3-metilcrotonilglicina
Acidúria 3-metilglutacônica	Ácido 3-metilglutacônico, ácido 3-metilglutárico, ácido 3-hidroxiisovalérico
Acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica	Ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico, ácido 3-metilglutacônico, ácido 3-metilglutárico, ácido 3-hidroxiisovalérico, 3-metilcrotonilglicina
Acidúria Glutárica tipo I	Ácido glutárico, ácido 3-hidroxi glutárico, ácido glutacônico
Acidúria Glutárica tipo II	Ácido glutárico, ácido etilmalônico, ácido adípico, ácido subérico, ácido 2-hidroxi glutárico, isovalerilglicina, isobutililglicina
Acidúria L-2-Hidroxi glutárica	Ácido L-2-hidroxi glutárico
Acidúria D-2-Hidroxi glutárica	Ácido D-2-hidroxi glutárico
Acidúria Fumárica	Ácido fumárico
Acidúria Mevalônica	Mevalonolactona, ácido mevalônico
Doença de Canavan	Ácido N-acetil aspártico
Acidúria D-Glicérica	Ácido D-glicérico
Hiperoxalúria Tipo I	Ácido oxálico, ácido glicólico, ácido glioxílico
Hiperoxalúria Tipo II	Ácido oxálico, ácido L-glicérico
Acidúria 4-Hidroxi butírica	Acido 4-Hidroxi butírico, ácido 3-4-dihidroxi butírico

1.3 Defeitos no metabolismo de ácidos graxos

Os defeitos hereditários na oxidação mitocondrial de ácidos graxos foram descritos inicialmente na década de 1970 em pacientes que apresentavam fraqueza muscular ou rabdomiólise induzida por exercício. Nesses pacientes os sintomas estavam associados a anormalidades no metabolismo muscular de ácidos graxos e a um decréscimo no conteúdo muscular de carnitina. Pouco tempo depois foi identificada a síndrome da deficiência sistêmica de carnitina, e, no início de década de 1980 , foi descrita a deficiência da desidrogenase da acil-Coenzima A (CoA) de cadeia média (MCAD). Desde então foram descritas pelo menos 23 diferentes desordens afetando a oxidação mitocondrial de ácidos graxos e a cetogênese (Roe & Ding, 2001; Rinaldo, 2001).

Os pacientes afetados por essas doenças apresentam, tipicamente, intolerância ao jejum associada à hepatopatia, miopatia e cardiomiopatia, além de anormalidades bioquímicas que manifestam-se principalmente durante as crises agudas e descompensações metabólicas (Ribes et al, 1998).

Acredita-se que a prevalência dos defeitos na oxidação dos ácidos graxos seja subestimada, não apenas porque os métodos para a detecção de metabólitos apresentam um alto custo e estão restritos a poucos laboratórios, mas também devido à presença intermitente dos metabólitos, que muitas vezes só aparecem em situações de descompensação metabólica (Roe & Ding, 2001; Ribes et al, 1998).

As desordens de oxidação mitocondrial de ácidos graxos podem ocorrer nas diferentes etapas do metabolismo dos ácidos graxos, compreendendo defeitos no ciclo da carnitina (no transporte da carnitina, na carnitina aciltransferase I (CPT I), na translocase de membrana carnitina/acilcarnitina e na carnitina aciltransferase II (CPT

II)), deficiências nas acil-CoA desidrogenases (na desidrogenase da acil-CoA de cadeia muito longa (VLCAD), na MCAD e na desidrogenase da acil-CoA de cadeia curta (SCAD)) e deficiências em outras enzimas da espiral de β -oxidação (na desidrogenase da 3-hidroxiacil-CoA de cadeia longa (LCHAD), na desidrogenase da 3-hidroxiacil-CoA de cadeia curta (SCHAD) e na 2,4-dienoil redutase) (tabela 1.6) (Roe & Ding, 2001).

Tabela 1.6 - Apresentação clínica dos defeitos de oxidação dos ácidos graxos

Doença	Hipoglicemia		Hepatopatia	Miopatia	Cardio- miopatia	Morte Súbita
	Jejum	Cetose				
a) Deficiências de enzimas da matriz mitocondrial						
MCAD	+	±	+	-	-	+++
SCAD	+	+	+	+++	-	+
SCHAD (fígado)	+	+	+	±	-	+++
SCHAD (músculo)	+	+	-	+	+	-
MCKAT	+	±	+	+++	+	+
2,4-dienoil-redutase	-	-	-	+++	-	-
HMG-CoA sintase	+++	-	+	-	-	-
HMG-CoA liase	+++	-	+	+	+	-
α-ETF (Acidúria glutárica II)	+++	-	+	+	+	+
β-ETF (Acidúria glutárica II)	+++	-	+	+	+	+
Forma responsiva à tiamina (Acidúria glutárica II)	+	-	-	+	-	-
b) Defeito de proteínas ligadas à membranas						
b.1) Membranas mitocondriais						
CPT-I (fígado)	+	-	+++	+	-	+
Translocase	+	-	+++	+	+++	+
CPT-II (início neonatal)	+	-	+	+	+++	+
CPTII (início tardio)	-	-	-	+++	-	-
VLCAD	+	-	+	+	+++	+++
ETF-QO (Acidúria glutárica II)	+++	-	+	+	+	+
LCHAD Isolada	+	-	+++	+	+++	+
α-TFP	+	-	+++	+	+++	+
β-TFP	+	-	+++	+	+++	+
B.2) Membrana plasmática						
Transporte de carnitina	+	-	+	+	+++	+
Transporte de ácidos graxos de cadeia longa	+	-	+++	-	-	-

- = não é manifestação comum; ± = manifestação ocasional; + = manifestação comum; +++ = manifestação frequente; CoA = coenzima A; MCAD = desidrogenase de acil-coA de cadeia média; SCAD = desidrogenase de acil-coA de cadeia curta; SCHAD = desidrogenase de 3-hidroxi-acil-CoA de cadeia curta; MCKAT = 3-cetoacil-CoA tiolase de cadeia média; HMG = 3-hidroxi-3-metilglutaril; CPT-I = carnitina palmitiltransferase I; CPT-II = carnitina palmitiltransferase II; VLCAD = desidrogenase de acil-CoA de cadeia muito longa; ETF = flavoproteína transferidora de elétrons. ; LCHAD = desidrogenase de hidroxiaçil-CoA de cadeia longa, TFP= proteína trifuncional

Os mecanismos patogênicos relacionados as manifestações clínicas das desordens da oxidação de ácidos graxos são basicamente dois: a intoxicação e a deficiência de energia. Na intoxicação, o acúmulo de substrato provoca uma toxicidade direta através de mecanismos ainda pouco conhecidos. Já a deficiência de energia deve-se ao fato de que a falta de oxidação de ácidos graxos resulta na escassez de energia, prejudicando funções celulares essenciais. Nessas doenças, o acúmulo das acil-CoA ácido graxo, seus metabólitos e outros produtos relacionados são os componentes tóxicos, enquanto a escassez de acetil-CoA e de equivalentes reduzidos prejudica a síntese de ATP através da fosforilação oxidativa, resultando na redução da energia celular. Há ainda diminuição da cetogênese hepática por falta de acetil-CoA (Rinaldo, 2001)

1.3.1 Produção de energia a partir de ácidos graxos

A principal fonte de energia para a síntese de ATP nos seres humanos é a oxidação dos ácidos graxos armazenados no tecido adiposo sob a forma de triglicerídeos, que na sua maioria são convertidos nas mitocôndrias a acetil-CoA usada como substrato para reações do ciclo de Krebs formando ATP, CO₂ e H₂O. No fígado, principalmente em situações de jejum ou exercício prolongado, grande parte do acetil-CoA formado é convertido nos corpos cetônicos acetoacetato e β-hidroxibutirato, que são liberados na corrente sanguínea servindo como fonte energética principalmente para o tecido muscular e os rins. Além disso, os corpos cetônicos também podem ser utilizados pelo cérebro, principalmente em situações de grande deficiência de energia, uma vez que nessas situações a produção e a concentração sanguínea dos corpos cetônicos estão aumentadas permitindo que esses entrem em maior quantidade no

cérebro, onde são oxidados, reduzindo a quantidade de glicose requerida pelo cérebro. Os corpos cetônicos também diminuem a necessidade de se utilizar os aminoácidos das proteínas musculares como fonte de carbono para a produção de glicose (gliconeogênese) pelo fígado, necessária para que a glicemia seja mantida em tais situações (Marks et al, 1996).

1.3.2 β -Oxidação de ácidos graxos

Os ácidos graxos são mobilizados das reservas do tecido adiposo e são transportados na circulação ligados à albumina até sua captação pelo fígado e outros órgãos, onde, no interior das mitocôndrias sofrerão β -oxidação originando acetil-CoA. Antes da β -oxidação, os ácidos graxos são ativados através de uma acil-CoA sintetase que utiliza ATP para formar acil AMP graxo e pirofosfato. O AMP é trocado por CoA e forma-se acil-CoA ácido graxo (Marks et al, 1996).

As acil-CoA com cadeia de tamanho superior a 10 carbonos precisam conjugar-se à carnitina para serem transportadas para dentro da mitocôndria. A enzima carnitina aciltransferase I (CPT I), localizada na membrana mitocondrial externa, catalisa a transferência do acil ácido graxo da CoA para a carnitina. A acil-carnitina formada atravessa a membrana mitocondrial interna através de uma translocase carnitina/acilcarnitina. Na matriz mitocondrial a enzima carnitina aciltransferase II (CPT II) transfere o acil graxo de volta para a CoA através da reesterificação das acilcarnitinas (Figura 1.2).

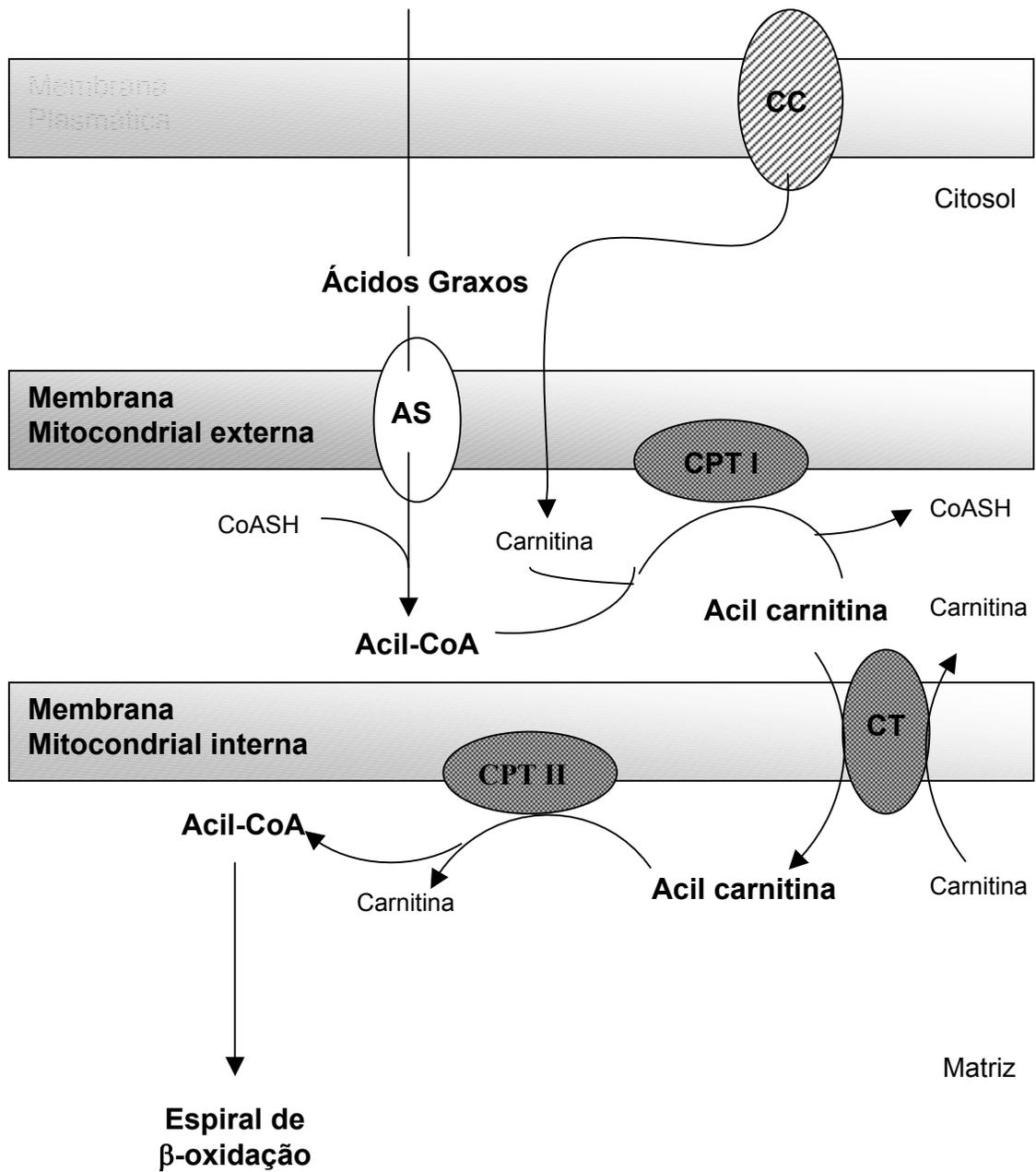


Figura 1.2 - Ciclo da Carnitina. CC= captação de carnitina; AS=acil-CoA sintetase; CoASH= coenzima A; CPT= carnitina aciltransferase; CT= carnitina/acilcarnitina translocase, (adaptado de Roe & Ding, 2001)

As acil-CoA, agora no interior da mitocôndria, são substrato para β -oxidação que é composta por ciclos de quatro etapas, cada um dos ciclos chamado de espiral da β -oxidação (Figura 1.3).

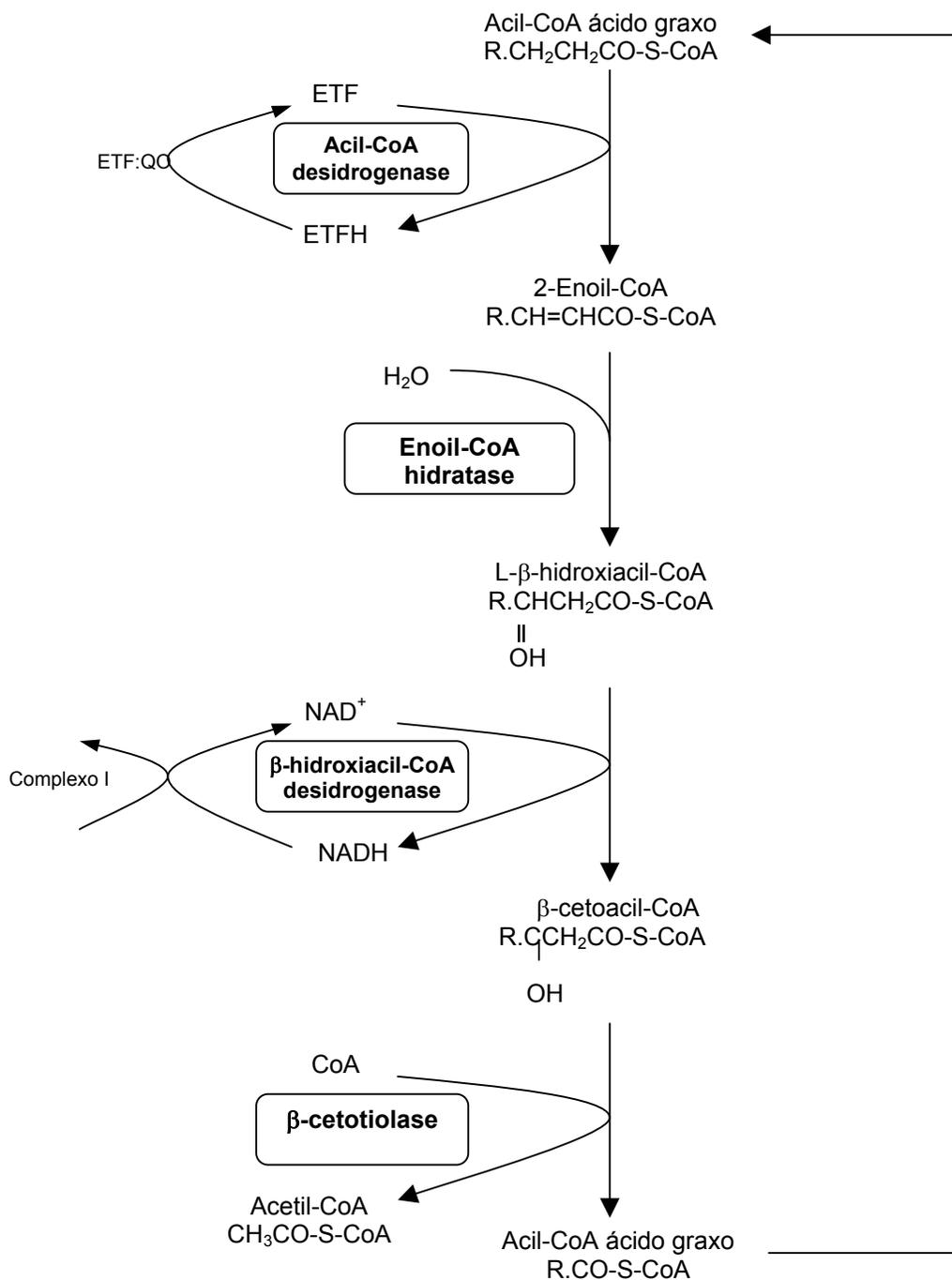


Figura 1.3 - Espiral da β -oxidação mitocondrial. ETF= flavoproteína transferidora de elétrons; ETF:QO= ETF:ubiquinona oxidoreductase; ETFH= ETF reduzido (adaptado de Eaton et. al., 1996)

Na primeira etapa, uma acil-CoA desidrogenase ligada ao nucleotídeo flavina adenina dinucleotídeo (FAD) retira 2 hidrogênios e seus elétrons do ácido graxo convertendo-o em enoil-CoA; o FAD(2H) gerado transfere seus elétrons para uma flavoproteína transferidora de elétrons (ETF) que os transfere à coenzima Q na cadeia transportadora de elétrons. Através da fosforilação oxidativa, a transferência de elétrons de cada FAD(2H) é responsável pela produção de aproximadamente 2 ATPs, regenerando o FAD.

A segunda etapa é a hidratação da enoil-CoA catalisada pela enzima enoil-CoA hidratase, resultando na formação de L- β -hidroxiacil-CoA, que, em uma terceira etapa é oxidado a β -cetoacil-CoA pela β -hidroxiacil-CoA desidrogenase em uma reação que envolve a redução de NAD^+ a NADH. A oxidação de cada NADH na cadeia respiratória gera aproximadamente 3 ATPs. A quarta e última etapa envolve a clivagem da ligação entre os carbonos α e β do β -cetoacil-CoA, catalisada pela enzima β -cetotiolase, gerando os produtos de um ciclo completo da espiral da β -oxidação, que são uma molécula de acetil-CoA e uma molécula de acil-CoA graxo cuja cadeia possui 2 carbonos a menos em relação à sua cadeia original. Esta operação (espiral) é repetida até que todos os carbonos do acil-CoA sejam convertidos em acetil-CoA.

Na realidade, para as reações da β -oxidação existem diferentes enzimas que atuam conforme o número de carbonos da cadeia do ácido graxo a ser oxidado. Assim, existe uma enzima que catalisa a reação dos ácidos graxos de cadeia curta (4 a 6 carbonos), uma para os de cadeia média (4 a 12 carbonos), uma para os de cadeia longa (12 a 18 carbonos) e outra para os de cadeia muito longa (14 a 20 carbonos), cujas especificidades muitas vezes são sobrepostas conforme o comprimento da cadeia

dos substratos. Dessa forma, existem 4 diferentes acil-CoA desidrogenases: desidrogenase para acil-CoA de cadeia curta (SCAD), desidrogenase para acil-CoA de cadeia média (MCAD), desidrogenase para acil-CoA de cadeia longa (LCAD) e desidrogenase para acil-CoA de cadeia muito longa (VLCAD).

Os ácidos graxos contendo cadeia de número ímpar de carbonos são convertidos, na última etapa da β -oxidação em acetil-CoA e propionil-CoA, o último sendo carboxilado e mais tarde convertido a succinil-CoA, que tanto pode servir de substrato para o ciclo de Krebs, como também formar malato, um possível precursor de glicose através da gliconeogênese.

Para a β -oxidação dos ácidos graxos insaturados, entretanto, são necessárias duas enzimas adicionais, uma isomerase, que transfere as ligações duplas até ficarem entre os carbonos α e β (ou 2 e 4) e em configuração trans e uma redutase, que reduz o composto insaturado às custas da oxidação do NADPH a NADP^+ , eliminando a ligação dupla e, desta maneira, as demais etapas da oxidação voltam a ocorrer normalmente.

Os ácidos graxos de cadeia muito longa (20 a 26 carbonos) são oxidados nos peroxissomas através de um processo que não produz ATP, mas que resulta na produção de octanoil-CoA, substância passível de ser β -oxidada na mitocôndria. Neste caso, além de gerar ATP, via transferência de elétrons para o FAD, também resulta na produção de acetil-CoA.

Outro processo envolvido na degradação de ácidos graxos de cadeia muito longa é a α -oxidação, que ocorre preponderantemente no cérebro, através do qual o ácido

graxo perde um carbono por vez e em seguida passa a ser oxidado por β -oxidação (Marks et al, 1996).

1.4 Deficiência de desidrogenase para acil-CoA de cadeia curta (SCAD)

A deficiência de desidrogenase das acil-CoA de cadeia curta (SCAD) é uma defeito no último ciclo de β -oxidação, sendo específica para ácidos graxos de cadeia curta (4 a 6 carbonos). A SCAD se localiza na matriz mitocondrial e catalisa a primeira reação de cada ciclo de β -oxidação. O defeito na SCAD causa o acúmulo de ácidos orgânicos de cadeia curta, principalmente dos ácidos etilmalônico e metilsucínico, formados pela metabolização por rotas secundárias do butiril-CoA acumulado. Além desses metabólitos, acumulam-se butirilglicina e butirilcarnitina (Roe & Ding, 2001; Tein et al, 1999).

O defeito na SCAD manifesta-se principalmente no período neonatal, podendo manifestar-se também durante a infância e até mesmo na idade adulta (Bhala et al, 1995). A sintomatologia apresenta-se bastante heterogênea, incluindo acidose metabólica, acidose láctica, vômitos, atraso no desenvolvimento, convulsões, fraqueza muscular e miopatia crônica. Entretanto, a maioria dos pacientes apresenta sinais neurológicos e fraqueza muscular (Ribes et al, 1998; Tein et al, 1999; Bhala et al, 1995; Corydon et al, 1996).

A deficiência de SCAD diferencia-se de outros defeitos na oxidação de ácidos graxos por não apresentar episódios de hipoglicemia hipocetótica e por apresentar sinais neurológicos, tais como hipotonia, hipertonia, hiperatividade ou retardo no desenvolvimento (Tein et al, 1999; Bhala et al, 1995). O sintoma mais comum apresentado pelos pacientes portadores dessa deficiência parece ser a alteração

neurológica, o qual pode estar relacionado ao acúmulo de ácidos orgânicos de cadeia curta e sua toxicidade ao sistema nervoso central (Bhala et al, 1995; Dawson et al, 1995).

1.4.1 Achados laboratoriais na deficiência de SCAD

Os achados laboratoriais comumente encontrados na deficiência de SCAD são acidose metabólica (severa ou moderada) e acidose láctica. Os níveis de carnitina apresentam-se normais, porém a razão carnitina esterificada/carnitina livre encontra-se aumentada, provavelmente devido ao acúmulo de acilcarnitinas de cadeia curta (Tein et al, 1999; Bhala et al, 1995).

1.4.2 Patogênese

A SCAD catalisa a desidrogenação de compostos acil-CoA com 4 a 6 carbonos e se localiza no interior da mitocôndria. Esta enzima participa do último ciclo de oxidação dos ácidos graxos (Dawson et al, 1995).

A deficiência de SCAD provoca um defeito na desidrogenação do butiril-CoA, que se acumula dentro da célula ativando uma rota metabólica secundária. O butiril-CoA acumulado é então carboxilado pela enzima propionil-CoA carboxilase, formando etilmalonil-CoA que pode ser hidrolisado formando o ácido etilmalônico livre ou ser isomerizado formando metil-sucinil-CoA que posteriormente formará o ácido metilsucínico livre. A deficiência de SCAD é caracterizada pela excreção aumentada dos ácidos etilmalônico e metilsucínico na urina dos pacientes afetados. A excreção torna-se maior ainda em situações de estresse metabólico, como em infecções (Tein et al, 1999) (Figura 1.4).

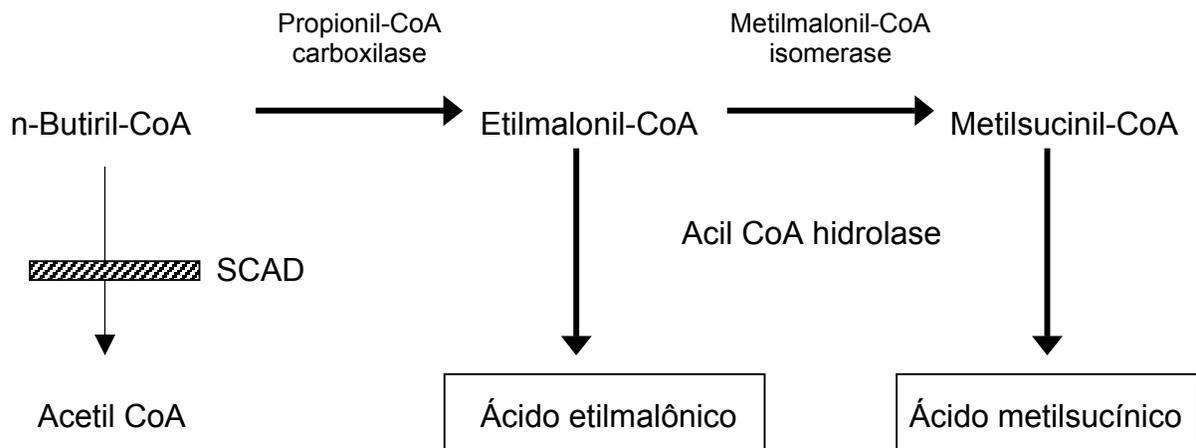


Figura 1.4 - Formação dos metabólitos na deficiência de SCAD a partir do metabolismo alternativo do n-butiril-CoA (adaptado de Sewell, 1993)

Distintamente de outras doenças da oxidação de ácidos graxos, como as deficiências de MCAD e LCAD, os pacientes com deficiência de SCAD não apresentam intolerância ao jejum ou hipoglicemia. É possível que cetogênese e a gliconeogênese estejam estimuladas devido à oxidação normal dos ácidos graxos de cadeia longa e média (Bhala et al, 1995).

1.4.3 Metabólitos acumulados na deficiência de SCAD

A análise da urina de pacientes com SCAD por cromatografia gasosa (CG) e espectrometria de massa (EM) mostra níveis elevados dos ácidos etilmalônico e metilsucínico. A análise das acilglicinas demonstra um aumento na concentração de butirilglicina e um leve aumento nos níveis de isovalerilglicina (Tein et al, 1999; Bhala et al, 1995; Dawson et al, 1995).

Através de espectrometria de massa em Tandem (MS/MS) podem ser identificadas e quantificadas as acilcarnitinas no sangue e na urina dos pacientes. Observa-se nesses casos uma concentração elevada de butirilcarnitina (Roe & Ding, 2001; Bhala et al, 1995).

Os níveis dos metabólitos acumulados na deficiência de SCAD apresentam-se mais elevados em situações de descompensação metabólica. O diagnóstico é confirmado pela determinação da atividade da enzima SCAD em amostras de músculo ou em fibroblastos cultivados (Bhala et al, 1995).

1.4.4 Aspectos moleculares da deficiência de SCAD

O gene da SCAD está localizado no cromossoma 12 e codifica uma flavoproteína mitocondrial tetramérica. As alterações gênicas relacionadas a deficiência de SCAD parecem ser bastante heterogêneas, tendo sido identificadas, até o momento, seis diferentes mutações, o que torna o desenvolvimento de um teste de triagem em massa baseado em análise de DNA de baixa eficiência (Roe & Ding, 2001; Tein et al, 1999; Bhala et al, 1995)

1.4.5 Outros distúrbios com acidúria etilmalônica

A acidúria etilmalônica (AE) é um achado característico das desordens da oxidação de ácidos graxos principalmente na deficiência de SCAD. No entanto, há pacientes que não possuem deficiência dessa enzima e que apresentam excreção aumentada do ácido etilmalônico. Burlina et al. (1994) descreveram pacientes que apresentavam AE, acompanhada do aumento das acilglicinas e acilcarnitinas de cadeia curta e ramificada com características clínicas diferentes daquelas observadas nas

desordens de oxidação de ácidos graxos. Esses achados, associados à atividade normal das enzimas relacionadas à oxidação de ácidos graxos, foram descritos como síndrome da encefalopatia etilmalônica (Scriver et al, 2001; Ozand et al, 1994).

Essa síndrome se manifesta em geral entre 6 e 12 meses de vida. Os pacientes apresentam hipotonia neonatal, acrocianose ortostática, petéquias, diarreia crônica, retardo mental e anormalidades cerebrais nas imagens de ressonância magnética (Scriver et al, 2001; Burlina et al, 1994). A acrocianose ortostática, as petéquias e, ainda, edema distal têm sido atribuídas a uma possível vasculopatia. A diarreia crônica não tem sua etiologia definida, porém tem sido relacionada com a mudança de alimentação do leite materno para fórmulas comerciais (Burlina et al, 1994; Garcia-Silva et al, 1997).

O acúmulo do ácido etilmalônico, que aparece em elevadas concentrações na urina, é acompanhado por um leve aumento na concentração urinária do ácido metilsucínico. O ácido etilmalônico acumulado pode ser derivado da carboxilação elevada do butiril-CoA ou do catabolismo da isoleucina por uma rota secundária. Durante os episódios agudos, também ocorre acúmulo dos ácido 3-etil-3-hidroxiopropiônico e ácido láctico. As acilglicinas derivadas de butiril-CoA e de compostos acil-CoA formados do catabolismo da leucina, isoleucina e valina também são excretadas em concentrações elevadas, sendo encontrados na urina dos pacientes a isobutirilglicina, a isovalerilglicina, a n-butilglicina e a 2-metilbutirilglicina (Scriver et al, 2001). A maioria desses metabólitos são identificados e quantificados através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa que auxiliam o diagnóstico dessa doença (Burlina et al, 1994).

1.5 Metabolismo energético cerebral

O cérebro é um dos órgãos mais ativos metabolicamente, entretanto possui reservas energéticas extremamente pequenas em relação a sua alta taxa metabólica (Dickinson, 1996).

A glicose é o principal metabólito energético no cérebro (Erecinska & Silver, 1994). Em condições normais o metabolismo energético nos tecidos neurais é mantido, quase que exclusivamente, pelo metabolismo oxidativo da glicose (Socoloff, 1993). A oxidação da glicose no cérebro ocorre mais rapidamente do que em outros órgãos como fígado, coração ou rins. Em contraste com outros tecidos, o cérebro não necessita de insulina para captar e oxidar a glicose (Dickinson, 1996).

No jejum, corpos cetônicos podem substituir mais de 50 % das necessidades energéticas do cérebro (Dickinson, 1996).

A oxidação da glicose através da via glicolítica forma piruvato, que é convertido a CO_2 e H_2O no ciclo de Krebs e na cadeia transportadora de elétrons. O acoplamento entre a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa gera grande parte do ATP necessário ao cérebro (Erecinska & Silver, 1994)

É bem conhecido que no cérebro a fosforilação oxidativa fornece em torno de 95% de todo o ATP sintetizado. Em condições normais, onde não existe falta de oxigênio, a fosforilação oxidativa é dependente de dois parâmetros: a concentração de ATP, ADP e fosfato (P_i) e da razão mitocondrial de NADH/NAD^+ , a qual é determinada pela atividade da cadeia transportadora de elétrons e pelo fornecimento de equivalentes reduzidos (elétrons) por enzimas mitocondriais. A cadeia transportadora de elétrons oxida o NADH e bombeia prótons para o espaço intermembrana da mitocôndria

formando assim um gradiente de prótons que ativa a ATP sintase que produz ATP na fosforilação oxidativa (Erecinska & Silver, 1994).

O mecanismo que auxilia a manutenção dos níveis cerebrais de ATP é o sistema da creatina quinase. A creatina quinase está presente tanto no citosol quanto ligada às membranas mitocondriais e catalisa a transferência reversível de um fosfato entre a fosfocreatina e o ATP. O alto fluxo da reação na direção da síntese de ATP, em situações de consumo de ATP, indica que a reação é crucial para a manutenção de concentrações constantes dos substratos energéticos no citosol. O sistema creatina/fosfocreatina/creatina quinase tem sido associado a algumas funções, particularmente importantes para o cérebro: tamponamento energético (através da regeneração do ATP e da manutenção de níveis baixos de ADP) e transferência de ATP de sítios de produção para outros de consumo (Erecinska & Silver, 1994).

1.5.1 Creatina quinase

A enzima creatina quinase (CK) fosforila a creatina formando fosfocreatina (PCr), e também catalisa a reação inversa através da seguinte reação reversível:



Tecidos que possuem uma alta demanda de energia, como músculo esquelético, músculo cardíaco e cérebro, apresentam uma maior concentração de CK, porque esta enzima regenera o ATP, que é muito consumido nesses tecidos, a partir da fosfocreatina (Wyss et al, 1992). O sistema creatina quinase/fosfocreatina é visto tanto como um tampão energético, por manter os níveis de ATP, quanto como um

transferidor de grupos fosfato de alta energia de áreas de produção de ATP para locais de consumo de ATP (Boehm et al, 1996).

Atualmente são conhecidas cinco isoformas da CK. Três são encontradas no citoplasma e duas na mitocôndria (CK_{mi}). As isoformas citosólicas formam dímeros, chamados MM-CK, MB-CK e BB-CK, compostos por dois tipos de subunidades (monômeros), o monômero M (tipo muscular) e o monômero B (tipo cerebral). A isoforma MM-CK é encontrada predominantemente em músculo esquelético adulto e no músculo cardíaco, a BB-CK está presente principalmente em tecidos neurais, e a MB-CK é somente encontrada em coração (Wyss et al, 1992; Boehm et al, 1996).

As isoformas mitocondriais são constituídas da CK_{mi} *a* e *b*, a primeira encontrada em todos os tecidos e a segunda presente no músculo sarcomérico (O'Gorman, 1996). As isoformas são encontradas no espaço intermembrana (entre a membrana mitocondrial interna e externa), de forma livre ou então ligada a membrana mitocondrial interna. Essas isoenzimas distintamente das isoformas citosólicas podem se apresentar tanto na forma dimérica quanto octamérica (Wyss et al, 1992). A forma octamérica é considerada predominante e a forma ativa *in vivo*, sendo muito importante para várias funções da enzima (Soboll et al, 1999).

A CK_{mi} , na forma octamérica, interage simultaneamente com as membranas mitocondriais interna e externa e está acoplada à translocase de adenina nucleotídeo que transporta o ATP produzido pela fosforilação oxidativa. Dessa forma, a energia produzida no interior da mitocôndria na forma de ATP é transferida para o citosol na forma de PCr.



A atividade da CK e as concentrações de creatina e PCr são importantes para o tamponamento energético e para a transferência de energia dos sítios de produção de ATP para os sítios de consumo que utilizam as ATPases, evitando assim variações grandes nos níveis celulares de ATP e ADP do metabolismo celular (Wyss et al, 1992; O'Gorman et al, 1996).

Alterações na atividade da CK são associadas com vários estados patológicos. A depressão da atividade da CK no coração está relacionada a cardiomiopatias e falência cardíaca (Konorev et al, 1998) e pacientes com miopatias mitocondriais apresentam mitocôndrias aumentadas de volume com CK_{mi} (O'Gorman et al, 1996).

Estudos recentes têm demonstrado a suscetibilidade da CK ao peroxinitrito (derivado do óxido nítrico), devido à suscetibilidade de seus grupamentos tióis frente a agentes oxidantes. O sítio ativo da CK contém um resíduo essencial de cisteína e um sítio de ligação a ADP contendo tirosina. Esses sítios podem ser alvos a ação do peroxinitrito. Modificação ou oxidação desses resíduos podem ser responsáveis pela redução na atividade da enzima (Konorev et al, 1998). O peroxinitrito causa uma diminuição da razão entre as formas octamérica e dimérica da CK_{mi} e uma redução na atividade da CK_{mi}, causando uma redução no metabolismo energético mitocondrial no coração (Soboll et al, 1999; Stachowiak et al, 1998).

1.5.2 Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa, constituída pelo processo acoplado da transferência de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons (ou cadeia respiratória) e pela fosforilação do ADP, é responsável pela síntese da quase totalidade do ATP gera nas células (Marks et al, 1996).

A respiração celular começa com a oxidação de substratos em várias vias metabólicas com a transferência de elétrons para o NAD^+ e o FAD, convertendo-os em NADH e FAD(2H), respectivamente (Marks et al, 1996).

Em uma segunda fase os elétrons do NADH e do FAD(2H) são transferidos através da cadeia respiratória por uma seqüência de pares redox, fornecendo energia para a síntese de ATP pelo processo de fosforilação oxidativa. Segundo a teoria quimiosmótica, tal energia origina-se do gradiente de prótons gerado pelo bombeamento de prótons pelos complexos I, III e IV da cadeia respiratória para o espaço intermembranas (entre as membranas mitocondrial interna e externa) (Marks et al, 1996).

A cadeia respiratória é constituída, portanto, de uma seqüência de carreadores de elétrons (pares redox) em sua maioria ligados a proteínas inseridas na membrana mitocondrial interna que recebem elétrons do par redox anterior e os transfere para o par redox seguinte até chegarem ao seu acceptor final, o O_2 formando H_2O (Figura 1.5) (Marks et al, 1996).

A cadeia respiratória possui vários complexos protéicos: NADH desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), complexo citocromo b-c₁ (complexo III) e citocromo oxidase (complexo IV), além de elementos móveis que se localizam entre os complexos. Esses elementos móveis consistem na coenzima Q

(CoQ), que é um componente não protéico lipossolúvel que carrega elétrons entre os complexos I e III, e o citocromo c, uma pequena proteína localizada na face externa da membrana que transfere os elétrons do complexo III para o complexo IV (Marks et al, 1996).

1.5.2.1 NADH desidrogenase (Complexo I)

O complexo I contém flavina mononucleotídeo (FMN) e centros ferro-enxofre (Fe-S). FMN recebe elétrons do NADH e é capaz de transferi-los aos centros Fe-S. O NADH é reoxidado a NAD^+ , o qual retorna para o ciclo de Krebs ou para outras rotas metabólicas para receber elétrons. Os centros Fe-S estão envolvidos na transferência de elétrons para a CoQ e vice-versa (Marks et al, 1996).

1.5.2.2 Coenzima Q

A CoQ, também chamada de ubiquinona, é o único componente da cadeia respiratória que não é ligado a proteínas. A CoQ é capaz de difundir-se através dos lipídios da membrana mitocondrial interna, devido ao alto grau hidrofóbico da sua cadeia lateral. Este movimento transmembrana faz parte do mecanismo de bombeamento de prótons da NADH desidrogenase e do complexo b-c₁ (Marks et al, 1996).

1.5.2.3 Complexo II e Succinato desidrogenase

O complexo II, também conhecido como succinato: ubiquinona oxirredutase (Abeles, Frey, Jencks, 1992), é um tetrâmero composto por duas subunidades polipeptídicas catalíticas que correspondem à succinato desidrogenase solúvel (SDH) ou

sucinato: metassulfato de fenazina oxirredutase (Fischer et. al., 1985), e duas subunidades polipeptídicas ancoradas na membrana mitocondrial interna. A succinato desidrogenase ocupa uma posição única como parte integrante do ciclo do ácido cítrico e também da cadeia respiratória (Oyedotum & Lemire, 1999). Ligado à SDH, o FAD recebe 2 elétrons e é reduzido a FAD(2H). Este transfere seus elétrons para os centros Fe-S da enzima que então doa esses elétrons para a CoQ, para que estes fluam pela cadeia respiratória. Esse complexo, diferente dos outros (complexos I, III e IV), não funciona como bomba de prótons, não gerando gradiente eletroquímico (Marks et al, 1996).

1.5.2.4 Complexo b-c₁ (Complexo III) e citocromo c

Os citocromos são proteínas que contêm um grupo heme (um átomo de ferro ligado a um núcleo porfirina formado por 4 anéis pirrólicos). Os elétrons fluem entre os citocromos no sentido do citocromo de menor potencial redox para o de maior. Os átomos de ferro nos citocromos se encontram no estado Fe⁺³. Quando este recebe um elétron é reduzido para Fe⁺², e, ao passar este elétron para o próximo componente da cadeia respiratória, o ferro é reoxidado a Fe⁺³.

Os citocromos b e c₁, juntamente com outras proteínas, formam o complexo de membrana b-c₁. O citocromo c é uma pequena proteína localizada na face externa da membrana mitocondrial interna, e, assim como a CoQ, é um transportador móvel de elétrons que transfere os elétrons do complexo b-c₁ para a citocromo oxidase (Marks et al, 1996).

1.5.2.5 Citocromo oxidase (Complexo IV)

A citocromo oxidase (COX), último complexo da cadeia respiratória, transfere elétrons do citocromo c para o O_2 . Este complexo contém os citocromos a e a_3 e um sítio de ligação ao O_2 . Cada molécula de O_2 precisa receber 4 elétrons para ser reduzida a 2 H_2O . Na COX a presença de íons Cu^{+2} facilita a redução do O_2 . Como o K_m da COX para o O_2 é muito menor que o K_m da mioglobina e da hemoglobina, o O_2 dos eritrócitos é facilmente transferido para seus sítios de redução (Marks et al, 1996).

1.5.2.6 Bombas de prótons

O bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço entre as membranas interna e externa (espaço intermembranas) da mitocôndria ocorre simultaneamente com a transferência de elétrons entre o NADH e a CoQ (catalisado pelo complexo I - NADH desidrogenase), entre a CoQ e o citocromo c (catalisado pelo complexo III - complexo citocromo b- c_1). A cada ciclo, a CoQ recebe 2 prótons e 2 elétrons da matriz mitocondrial. Ela transfere os 2 prótons para o espaço intermembranas e doa um elétron de volta para outro componente do complexo III e o outro para o citocromo c. O citocromo c transfere então este elétron para a COX (complexo IV) que também bombeia prótons para fora da matriz, contribuindo para a formação do gradiente de prótons. O complexo II não atua diretamente como bomba de prótons e participa diretamente do ciclo de Krebs (Marks et al, 1996).

1.5.2.7 Transferência seqüencial de elétrons

O fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons deve ser seqüencial a partir do NADH ou FAD(2H) até o O₂ para que ocorra a geração de ATP. Na cadeia respiratória cada complexo que funciona como bomba de prótons está associado a formação de 1 ATP. Entretanto, o bloqueio em qualquer ponto da cadeia transportadora de elétrons previne a formação de qualquer ATP, isto porque o bombeamento de prótons está associado ao movimento dos elétrons de um carreador para o seguinte e assim por diante. Caso este movimento esteja bloqueado em qualquer ponto, não ocorre o bombeamento de prótons para o espaço intermembranas e não ocorre a formação do potencial eletroquímico e conseqüentemente não há formação de ATP (Marks et al, 1996).

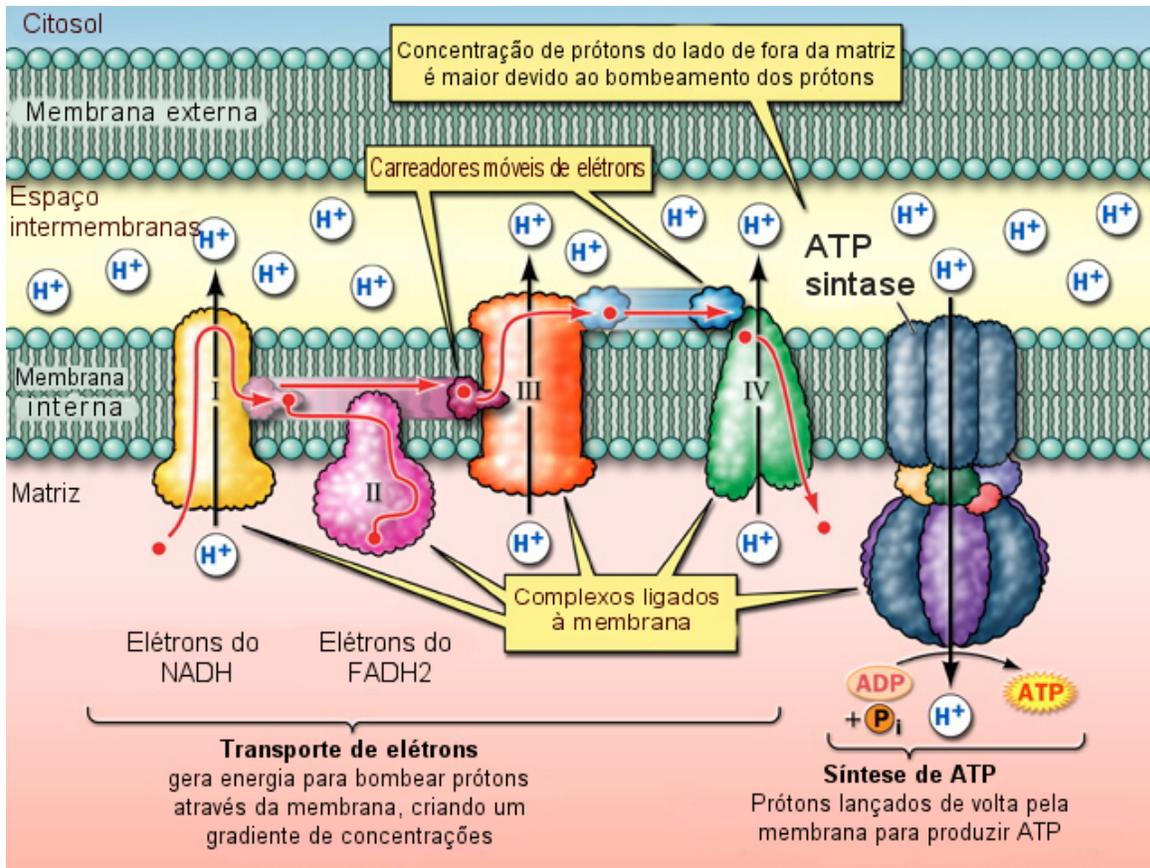


Figura 1.5 – Fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória (adaptado de Nelson; Cox, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

O presente trabalho visa investigar o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico, principais metabólitos acumulados na deficiência da desidrogenase das acil-CoA de cadeia curta, sobre algumas atividades enzimáticas fundamentais para o metabolismo energético em cérebro, músculo cardíaco e músculo esquelético de ratos, visando contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatogenia dessa doença.

2.2 Específicos

- a) Determinar os efeitos *in vitro* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre as atividades dos complexos da cadeia respiratória em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.
- b) Determinar os efeitos *in vitro* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre as atividades dos complexos da cadeia respiratória em homogeneizado de músculo esquelético de ratos.
- c) Determinar os efeitos *in vitro* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre as atividades dos complexos da cadeia respiratória em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos.
- d) Determinar os efeitos *in vitro* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de córtex cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos.
- e) Determinar os efeitos *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de córtex cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos.

f) Determinar os efeitos *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase na fração citosólica de córtex cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

- Agitador de tubos modelo Maxi Mix Plus (Thermolyne).
- Agitador magnético modelo 1005 (Fisaton).
- Balança analítica digital (Sartorius Basic).
- Balança digital modelo 430-21 (Kern).
- Balança modelo V-200 (Acculab).
- Banho-maria modelo 1052 (Biomatic).
- Centrífuga modelo 5403 (Eppendorf).
- Centrífuga Sorval OTD-65B
- Centrífuga Sorvall DC-2B
- Espectrofotômetro de leitura cinética e com controlador de temperatura (Hitachi).
- Espectrofotômetro modelo Spectronic Genesys 5 (Milton Roy).
- Freezer -20° modelo H5 Electrolux (Prosdócimo)
- Freezer -70°C (Scien Temp).
- Geladeira (Brastemp).
- Homogenizador elétrico modelo Potter S (B. Braun Biotech International)
- Máquina de fazer gelo (Everest).
- Potenciômetro modelo Tec-2 (Tecnal).

3.2 Reagentes utilizados para a determinação das atividades dos complexos da cadeia respiratória

- Ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) sal dissódico - Sigma
- Ácido etilmalônico - Sigma
- Ácido metilsucínico - Sigma
- Albumina bovina -
- Antimicina - Sigma
- Azida sódica - Sigma
- Borohidrato de sódio - Sigma
- Cianeto de potássio - Merck
- Citocromo c - Sigma
- Cloreto de magnésio ($MgCl_2$) - Sigma
- Decilubiquinona - Sigma
- Dicloroindofenol (DCIP) - Sigma
- Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)- Reagen
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)- Reagen
- Heparina 5000 U.I./mL - Cristália
- Hidróxido de potássio - Merck
- Lauril-maltósito - Sigma
- Metassulfato de fenazina (PMS) - Sigma
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) - Sigma
- Rotenona - Sigma
- Succinato de sódio hexahidratado - Sigma

3.3 Reagentes utilizados para a determinação da atividade da creatina quinase

- α -Naftol - Sigma
- Ácido ascórbico
- Ácido p-hidroximercuribenzóico - Sigma
- Adenina-5'-difosfato (ADP) - Sigma
- Creatina - Sigma
- Diacetil - ICN
- Fosfocreatina - Sigma
- Glutationa - Sigma
- Glutationa (Glu-Cys-Gly; GSH) - Sigma
- Hidróxido de sódio - Vetec
- L-NAME
- Sulfato de magnésio heptahidratado - Reagen
- Trisma base -Sigma
- TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5-7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) - Sigma-Aldrich

3.4 Caracterização da amostra

Para a determinação das atividades enzimáticas dos complexos da cadeia respiratória e da creatina quinase, foram utilizadas amostras de vários tecidos (córtex cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco) de ratos Wistar de 30 dias de idade, de ambos os sexos, fornecidos pelo Departamento de Bioquímica – ICBS – UFRGS. Os ratos foram mantidos em temperatura constante (20 ± 1 °C), em intervalos de 12 horas de ciclo claro/escuro e alimentados com ração padrão (Supra ou Purina, São Leopoldo, RS) e livre acesso à água.

3.5 Determinação da atividade da creatina quinase

3.5.1 Soluções

a. *Tampão Trisma-sulfato de magnésio pH 7,5 (trisma-base 100 mM e MgSO₄ 15 mM).*

Solubilizar 2,42 g de trisma-base e 0,740 g de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄) em 180 mL de água MilliQ, ajustar o pH até 7,4 com HCl 10 N e completar o volume até 200 mL com água MilliQ.

b. *Fosfocreatina (11,8 mM)*

Solubilizar 0,09 g de fosfocreatina em 30 mL do tampão trisma-sulfato de magnésio.

c. *ADP-glutationa (ADP 16 mM e glutatona 4 mM)*

Solubilizar 0,006146 g de glutatona em 5 mL de água MiliQ gelada e em seguida dissolver nessa solução 0,0342 g de Adenina-5'-difosfato (ADP). A solução final é separada em alíquotas de 500 µL e congelada.

d. *Hidróxido de sódio (NaOH) 10 N*

Solubilizar 4 g de hidróxido de sódio em 10 mL de água MiliQ.

e. *Ácido p-hidroximercuribenzóico (50 mM)*

Solubilizar 0,18035 g de ácido p-hidroximercuribenzóico (pHMB) em 10 mL de água MilliQ e 2 gotas de NaOH 10 N.

f. *Hidróxido de sódio (NaOH) 1,5 N*

Solubilizar 30 g de NaOH em 500 mL de água MiliQ.

g. *α-Naftol (20%)*

Solubilizar 0,20 mg de α-naftol, momento do uso, em 10 mL de NaOH 1,5 N.

h. *Solução de diacetil (20%)*

Misturar 20 µL de diacetil em 100 mL de água MiliQ.

i. *Solução de creatina-padrão (1 mM)*

Solubilizar 0,00262 g de creatina em 1 mL de água MiliQ.

3.5.2 Preparação de tecidos para a medida das atividades da creatina quinase

3.5.2.1 *Córtex cerebral, músculo esquelético e cardíaco de ratos*

Os ratos foram sacrificados por decapitação sem anestesia, o córtex cerebral, bem como o músculo soleus e o coração foram isolados rapidamente sendo constantemente umedecidos com solução salina isotônica e mantidos sobre placa de Petri invertida em gelo. As amostras foram homogeneizadas na proporção de 1:10 (P/V) em solução salina com pH ajustado para 7,5. Foram dosadas as concentrações de proteínas segundo o método de Lowry (1951). Alíquotas de amostra contendo 10 µL de homogeneizado foram congeladas.

3.5.2.2 *Preparação das frações mitocondrial e citosólica de córtex cerebral de ratos*

O homogeneizado foi centrifugado a 800 g por 10 minutos a 4°C, e o pellet descartado. O sobrenadante foi então centrifugado a 27.000 g por 30 minutos a 4°C em uma centrífuga Sorval DC-2B. O precipitado contendo as mitocôndrias foi utilizado como a fração mitocondrial após ser lavado 3 vezes com solução salina. O sobrenadante foi centrifugado por 60 minutos a 125.000 g em centrífuga Sorval OTD-65B a 4°C, o precipitado foi descartado e o citosol (sobrenadante) foi imediatamente utilizado para o ensaio enzimático. As concentrações de proteínas foram determinadas segundo o método de Lowry (1951).

3.5.3 Medida da atividade da creatina quinase

No momento das dosagens, as alíquotas contendo 10 μL das amostras foram descongeladas, acrescidas de 990 μL (diluição de 1:100) (córtex cerebral e músculo cardíaco de ratos) ou de 3990 μL de solução salina (diluição de 1:400) (músculo esquelético de ratos) e então homogeneizadas.

Após um período de 15 minutos de pré-incubação, a reação foi iniciada com a adição de ADP a uma concentração final de 3,2 mM em 100 μL de meio contendo 7,08 mM de fosfocreatina, 0,8 mM de glutatona e de 0,8 a 1 μg de proteínas (homogeneizado). Após um período de 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida com 20 μL de ácido p-hidroximercuribenzóico (pHMB) 50 mM e a coloração rósea foi obtida pela adição de 100 μL de α -naftol 20%, 680 μL de água MilliQ e 100 μL de diacetil 20%. A leitura foi feita por espectrometria a 540 nm segundo o método de Hughes (1962).

Para calcular a atividade da creatina quinase (CK) nas amostras, foi feita uma curva de calibração com creatina nas concentrações de 4 nmol/mL (60 μL de fosfocreatina, 10 μL de creatina-padrão e 10 μL de água MilliQ) e 8nmol/mL (60 μL de fosfocreatina e 20 μL de creatina-padrão. Daí obteve-se o fator de calibração médio (FCM) necessário para os cálculos de atividade da CK. Nas amostras de córtex cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos os ácidos etilmalônico e metilsucínico foram testados nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,5 mM. Os resultados foram comparados com os controles, em cujo meio não foi adicionado nenhum metabólito.

3.6 Determinação das atividades dos complexos da cadeia respiratória

3.6.1 Soluções

3.6.1.1 Soluções para preparação da amostra

a. Tampão SETH

Solubilizar 4,28 g de sacarose, 0,0372 g de EDTA, 0,0605 g de trisma-base e 0,5 mL de heparina 5000 U.I./mL em 40 mL de água MilliQ. Ajustar o pH para 7,4 com HCl e completar o volume para 50 mL.

3.6.1.2 Soluções para a determinação da atividade do Complexo I+CoQ+III

a. Tampão fosfato de potássio 20 mM pH 8,0

Solubilizar 0,175 g de K_2HPO_4 em 50 mL de água MilliQ (solução A) e 0,136 g de KH_2PO_4 em 50 mL de água MilliQ (solução B). Ajustar o pH da solução A adicionando a solução B até atingir pH 8,0.

b. Cianeto de potássio (KCN) 200 mM

Solubilizar 0,065 g de KCN em 5,0 mL de água MilliQ.

c. Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) 1 mM

Solubilizar 0,00709 g de NADH em 10 mL de água MilliQ.

d. Citocromo c 2 mM

Solubilizar (somente instantes antes do uso) 0,01218 g de citocromo c em 0,5 mL de água MilliQ.

e. EDTA 1 mM

Solubilizar 0,0037 g de EDTA dissódico em 10 mL de água MilliQ.

f. Rotenona 2 mM

Solubilizar 0,00159 g de rotenona em 2 mL de etanol absoluto.

3.6.1.3 Soluções para a determinação da atividade do Complexo II e SDH

a. Succinato 250 mM

Solubilizar 0,3376 g de succinato de sódio hexahidratado em 4 mL de água MilliQ, ajustar o pH para 7,4 com KOH. Completar o volume até 5 mL com água MilliQ.

b. Tampão fosfato 62,5 mM pH 7,4

Solubilizar 2,23 g de K_2HPO_4 em 200 mL de água MilliQ (solução A) e 1,275 g de KH_2PO_4 em 150 mL de água MilliQ (solução B). Adicionar a solução B em 150 mL da solução A até o pH tornar-se 7,4.

c. Dicloroindofenol (DCIP) 0,5 mM

Solubilizar 0,00145 g de DCIP em 10 mL de água.

d. Azida sódica 100 mM

Solubilizar 0,013 g de azida sódica em 2 mL de água MilliQ.

e. Rotenona 2 mM

Solubilizar 0,00159 g de rotenona em 2 mL de etanol absoluto.

f. Metassulfato de fenazina (PMS) 24 mM

Solubilizar 0,00735 g de metassulfato de fenazina em 1 mL de água MilliQ.

3.6.1.4 Soluções para a determinação da atividade do Complexo II+CoQ+III

a. Tampão fosfato de potássio 62,5 mM pH 7,4

Solubilizar 2,23 g de K_2HPO_4 em 200 mL de água MilliQ (solução A) e 1,275 g de KH_2PO_4 em 150 mL de água MilliQ (solução B). Adicionar a solução B em 150 mL da solução A até o pH tornar-se 7,4.

b. *Citocromo c 0,5%*

Solubilizar 0,010 g de citocromo c em 2 mL de água MilliQ.

c. *Azida sódica 100 mM*

Solubilizar 0,013 g de azida sódica em 2 mL de água MilliQ.

d. *Rotenona 2 mM*

Solubilizar 0,00159 g de rotenona em 2 mL de etanol absoluto.

e. *Sucinato 250 mM pH 7,4*

Solubilizar 0,3376 g de succinato de sódio hexahidratado em 5 mL de tampão fosfato de potássio 62,5 mM pH 7,4. Se necessário ajustar o pH com KOH para 7,4.

3.6.1.5 *Soluções para a determinação da atividade do Complexo III*

a. *Tampão fosfato 100 mM pH 7,5*

Solubilizar 4,35 g de K_2HPO_4 em 250 mL de água MilliQ (solução A) e 3,4 g de KH_2PO_4 em 250 mL de água MilliQ (solução B). Em 200mL da solução A acrescentar a solução B até o pH tornar-se igual a 7,5.

b. *Cloreto de magnésio 100 mM*

Solubilizar 0,060 g de $MgCl_2$ em 3 mL de água MilliQ.

c. *Albumina bovina 5 %*

Solubilizar 0,015 g de albumina bovina em 3 mL de água MilliQ.

d. *Cianeto de potássio 30 mM*

Solubilizar 0,020 g de KCN em 10 mL de água MilliQ.

e. *Citocromo c 1 mmol/L*

Solubilizar, no momento do uso, 0,01238 g de citocromo c em 1 mL de água MilliQ.

f. *Rotenona 10 mM*

Solubilizar 0,0197 g de rotenona em 5 mL de etanol absoluto.

g. *Decilubiquinona 20 mM*

Dissolver 10 μ mol de ubiquinona em 1mL de etanol, acidificar até pH 2 com ácido clorídrico (HCl) 6 M. Reduzir , então, a quinona com excesso de borato de sódio. Extrair o ubiquinol formado com a mistura dietiléter: ciclohexano (2:1, v/v), evaporar o solvente com gás nitrogênio e dissolver em 1 mL de etanol acidificado com HCl até pH 2.

h. *Antimicina 0,1 %*

Solubilizar 0,001 g de antimicina em 1 mL de água MilliQ.

3.6.1.6 *Soluções para a determinação da atividade do Complexo IV*

a. *Tampão fosfato 10 mM pH 7,0*

Solubilizar 0,348 g de K_2HPO_4 em 200 mL de água MilliQ (solução A) e 0,204 g de KH_2PO_4 em 150 mL de água MilliQ (solução B). Em 175 mL da solução A acrescentar a solução B até o pH tornar-se igual a 7,0.

b. *Lauril-maltosídeo 125 mM*

Solubilizar 0,319 g de lauril-maltósito em 5 mL de água MilliQ.

c. *Citocromo c reduzido*

Solubilizar em copo de béquer 0,025 g de citocromo c em 2,5 mL de água MilliQ. Adicionar 0,004 g de borato de sódio (Sigma), misturando-o por 2 minutos e

tampar o copo de béquer com Parafilm. Colocar a solução sobre o gelo e esperar por 30 minutos para ajustar o pH até 7,0 com HCl 1 N.

3.6.2 Preparação dos tecidos para a medida das atividades dos complexos da cadeia respiratória

Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia, o córtex, bem como o músculo soleus e o coração, foram rapidamente removidos, isolados e homogenizados 1:20 (P/V) em tampão SETH pH 7,4 com um homogenizador de vidro e teflon. Os homogenizados foram centrifugados a 800 g por 10 minutos e os sobrenadantes mantidos a -70°C até o momento das determinações enzimáticas.

As atividades dos complexos da cadeia respiratória foram medidas em meio contendo os ácidos etilmalônico e metilsucínico nas concentrações de 1 e 5 mM e foram comparadas com as dos controles, em cujo meio não foi adicionado nenhum dos ácidos.

3.6.3 Medida das atividades dos complexos da cadeia respiratória

3.6.3.1 Determinação da atividade do Complexo I + COQ + III (NADH: citocromo c oxirredutase)

O tampão de reação contendo 20 mM de fosfato de potássio pH 8,0, 2 mM de KCN, 10 μ M de EDTA, 50 μ M de citocromo c e 40-80 μ g de proteínas do homogeneizado foi mantido a 30°C por 1 minuto. A reação foi iniciada pela adição de 25 μ M de NADH, as absorbâncias foram registradas por 3 minutos, após os quais foram adicionados 10 μ M de rotenona. As absorbâncias continuaram sendo registradas por mais 3 minutos. A atividade do complexo I+CoQ+III foi medida pelo aumento na

absorbância causada pela redução do citocromo c a 550 nm. A atividade do complexo I+CoQ+III correspondeu à atividade da NADH:citocromo c redutase sensível à rotenona (Schapira et al, 1990).

3.6.3.2 *Determinação da atividade do Complexo II (succinato:DCIP oxirredutase)*

O meio de incubação era constituído de fosfato de potássio (40 mM pH 7,4), succinato de sódio (16 mM) e DCIP (8 μ M). Inicialmente pré-incubava-se com 40-80 μ g de proteínas do homogeneizado a 30°C por 20 minutos. Depois, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7 μ M de rotenona e a reação foi iniciada pela adição de 40 μ M de DCIP. As absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 600nm. A atividade do complexo II foi medida pela diminuição da absorbância causada pela redução do 2,6-dicloroindofenol (DCIP) a 600 nm (Fischer et al, 1985).

3.6.3.3 *Determinação da atividade da SDH (succinato:fenazina oxirredutase)*

O meio de reação constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), succinato de sódio (16 mM) e DCIP (8 μ M) foi pré-incubado com 40-80 μ g de proteína do homogeneizado a 30°C por 20 minutos. Depois foram adicionados 4mM de azida sódica, 7 μ M de rotenona e 40 μ M de DCIP. A reação foi iniciada pela adição de 1 mM de PMS. As absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 600 nm. A atividade da enzima succinato: fenazina oxiredutase (succinato desidrogenase solúvel- SDH) foi medida nas amostras de homogeneizado na presença de metassulfato de fenazina (PMS) pela diminuição na absorbância causada pela redução do 2,6-dicloroindofenol (DCIP) (Sorensen & Mehler, 1982).

3.6.3.4 *Determinação da atividade do Complexo II+CoQ+III (succinato: citocromo c oxirredutase)*

O meio de reação, constituído de fosfato de potássio (40 mM pH 7,4), de succinato de sódio (16 mM), foi pré-incubado com 40-80 µg de proteínas do homogeneizado a 30°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7µM de rotenona e a reação foi iniciada pela adição de 0,6 µg/mL de citocromo c e as absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 550 nm. A atividade do complexo II+CoQ+III foi medida pelo aumento da absorbância causado pela redução do citocromo c a 550 nm (Fischer et al,1985).

3.6.3.5 *Determinação da atividade do Complexo III (ubiquinol:citocromo c oxirredutase)*

A atividade do complexo III foi determinada de acordo com Birch-Marchin et al (1994) pela redução do citocromo c a 550 nm. Ao meio de incubação contendo fosfato de potássio (35 mM pH 7,5), MgCl₂ (5 mM), albumina bovina (2,5 mg/mL), decilubiquinona (60 µM), KCN (1,8 mM), rotenona (50 µM) e 20-40 µg de proteínas (homogeneizado) foram adicionados 125 µM de citocromo c. A atividade do complexo III foi medida por 3 minutos. Foram então adicionadas 3 µg/mL de antimicina A e a atividade foi medida por mais 3 minutos. A atividade do complexo III foi considerada como a atividade da citocromo c redutase sensível à antimicina.

3.6.3.6 *Determinação da atividade do Complexo IV (citocromo c oxidase)*

O meio de incubação continha tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0), lauril maltósito (0,6 mM) e 10-20 µg de proteínas (homogenizado). A reação foi iniciada com a

adição de 0,7 μg de citocromo c reduzido. A atividade do complexo IV foi medida a 25°C por 10 minutos. A atividade da citocromo c oxidase (COX) foi medida pelo decréscimo na absorbância devido à oxidação de citocromo c previamente reduzido. As leituras foram feitas em 550 nm (Rustin et al, 1994).

3.7 Análise estatística

Os dados foram analisados através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan quando o valor de F era significativo. O teste T de Student para as amostras pareadas também foi utilizado em alguns experimentos. A análise estatística foi realizada através do programa SPSS-PC. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos

4.1.1 Complexo I+III

Nesses experimentos, utilizou-se a concentração de 1 mM dos ácidos etilmalônico e metilsucínico para testar seus efeitos sobre os complexos da cadeia respiratória em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Verificou-se que os ácidos inibiram significativamente a atividade do complexo I+III nessa concentração (figuras 4.1 e 4.2) (ácido etilmalônico [t(3)= 0,05, p<0,05]; ácido metilsucínico [t(3)= 0,037, p<0,05]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

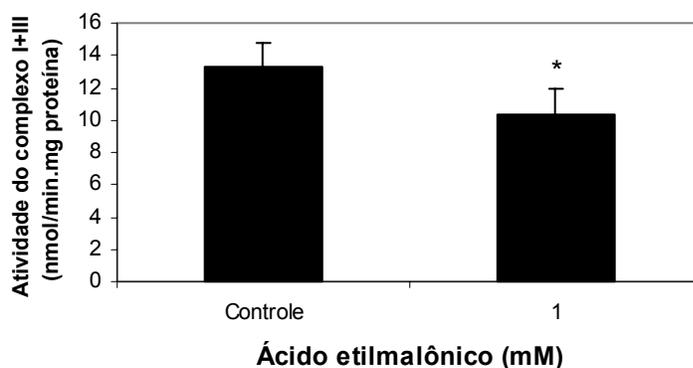


Figura 4.1 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo I+III em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata .

*p<0,05 em relação ao controle (Teste t de Student, para amostras pareadas).

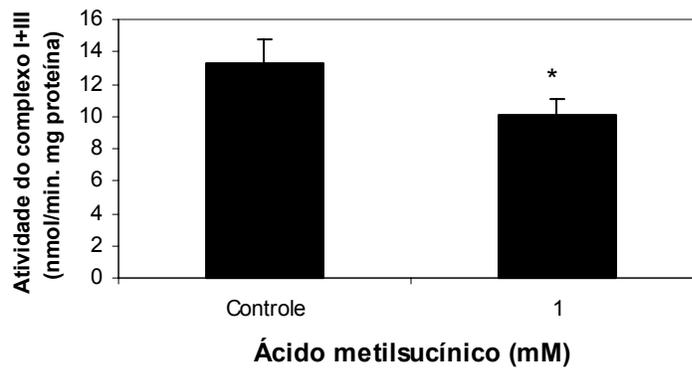


Figura 4.2 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo I+III em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata .

*p<0,05 em relação ao controle (Teste t de Student, para amostras pareadas).

4.1.2 Succinato desidrogenase - SDH

As figuras 4.3 e 4.4 mostram o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade da succinato desidrogenase solúvel (SDH). Verifica-se que os ácidos não alteraram a atividade da enzima na concentração de 1 mM (ácido etilmalônico [t(3)= 0,154, p>0,05]; ácido metilsucínico [t(3)= 0,151, p>0,05]. Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

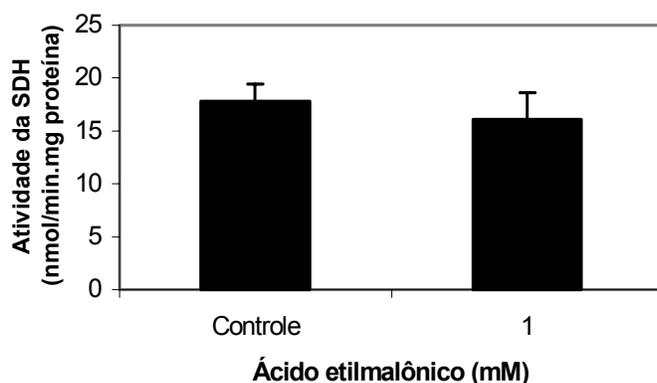


Figura 4.3 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade da SDH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata .

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (Teste t de Student, para amostras pareadas).

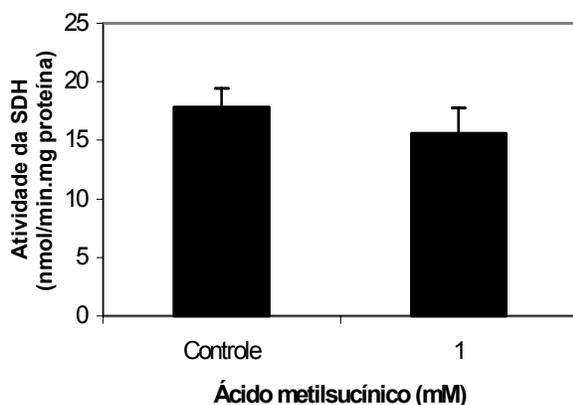


Figura 4.4 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade da SDH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata .

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (Teste t de Student, para amostras pareadas).

4.1.3 Complexo II

As figuras 4.5 e 4.6 mostram o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade do complexo II na concentração de 1 mM. Verifica-se que os ácidos não alteraram a atividade do complexo nessa concentração (ácido etilmalônico [t(3)=0,783, p>0,05] ; ácido metilsucínico [t(3)=0,300, p>0,05]. Os resultados estão expressos em nmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

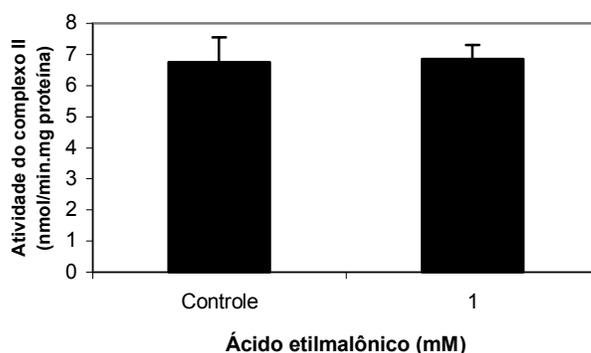


Figura 4.5 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo II em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata .

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (Teste t de Student, para amostras pareadas).

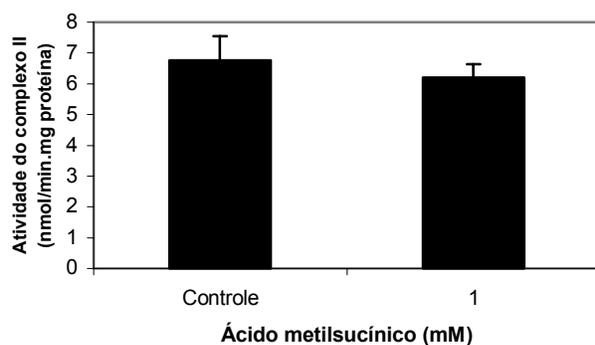


Figura 4.6 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo II em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata .

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (Teste t de Student, para amostras pareadas).

4.1.4 Complexo II+III

As figuras 4.7 e 4.8 mostram o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade do complexo II+III. Verifica-se que os ácidos não alteraram a atividade do complexo na concentração de 1 mM (ácido etilmalônico [t(2,15)= 0,362, p>0,05]; ácido metilsucínico [t(2,15)=0,362, p>0,05]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

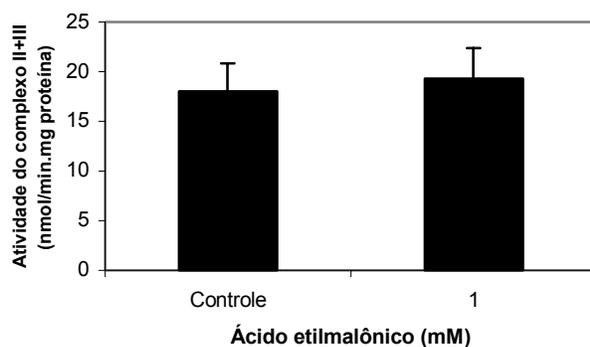


Figura 4.7 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo II+III em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=6). Todos os experimentos foram feitos em duplicata .

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (Teste t de Student, para amostras pareadas).

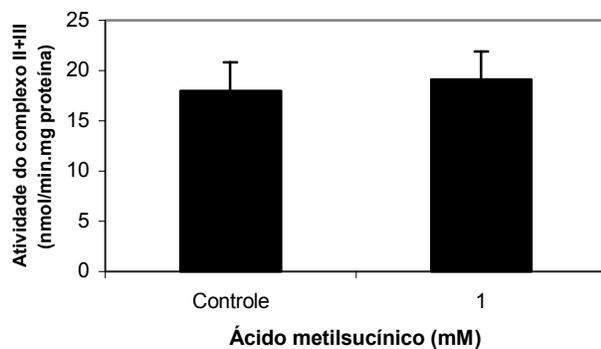


Figura 4.8 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo II+III em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=6). Todos os experimentos foram feitos em duplicata .

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (Teste t de Student, para amostras pareadas).

4.1.5 Complexo III

As figuras mostraram 4.9 e 4.10 o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade do complexo III. Verifica-se que os ácidos não alteraram a atividade do complexo na concentração de 1 mM (ácido etilmalônico [t(4)= 0,988, p>0,05]; ácido metilsucínico [t(4)= 0,249, p>0,05]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹.

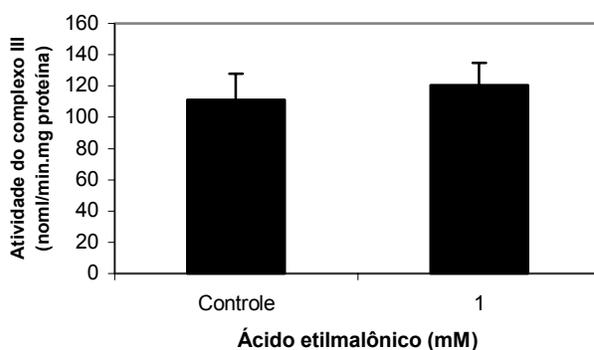


Figura 4.9 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo III em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata .

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (Teste t de Student, para amostras pareadas).

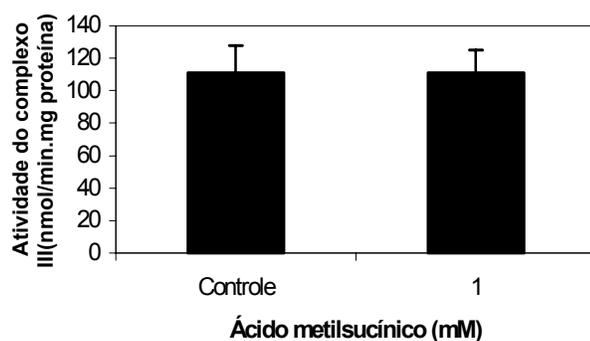


Figura 4.10 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo III em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata .

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (Teste t de Student, para amostras pareadas).

4.1.6 Complexo IV

O efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico também foi testado sobre a atividade do complexo IV. Nas figuras 4.11 e 4.12 verifica-se que os ácidos não alteraram a atividade do complexo na concentração de 1 mM (ácido etilmalônico [t(4)=0,880, p>0,05]; ácido metilsucínico [t(4)= 0,391, p>0,05]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

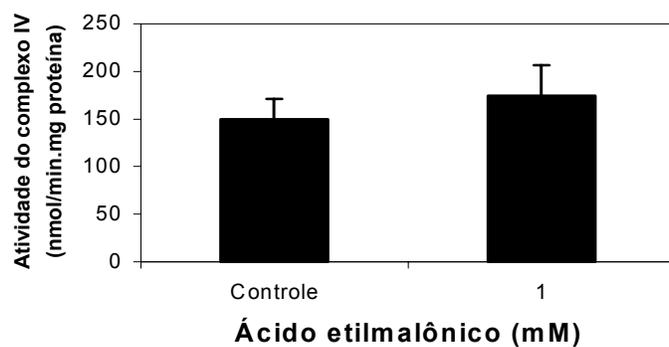


Figura 4.11 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo IV em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata .

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (Teste t de Student, para amostras pareadas).

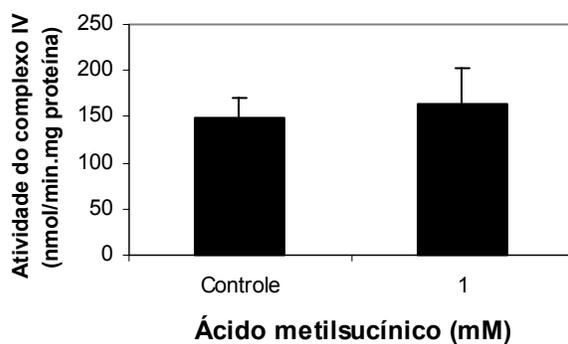


Figura 4.12 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo IV em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata .

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (Teste t de Student, para amostras pareadas).

4.2 Efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em músculo esquelético de ratos

4.2.1 Complexo I+III

O efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico foi testado sobre a atividade do complexo I+III da cadeia respiratória em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. As figuras 4.13 e 4.14 mostram que os ácidos etilmalônico e metilsucínico não alteraram a atividade do complexo nas concentrações de 1 e 5 mM (ácido etilmalônico [F(2,12)= 0,272, p>0,05]; ácido metilsucínico [F(2,12)=0,434, p>0,05]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹.

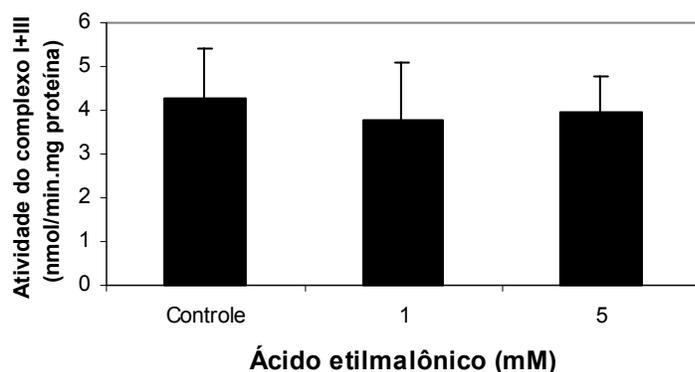


Figura 4.13 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo I+III em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

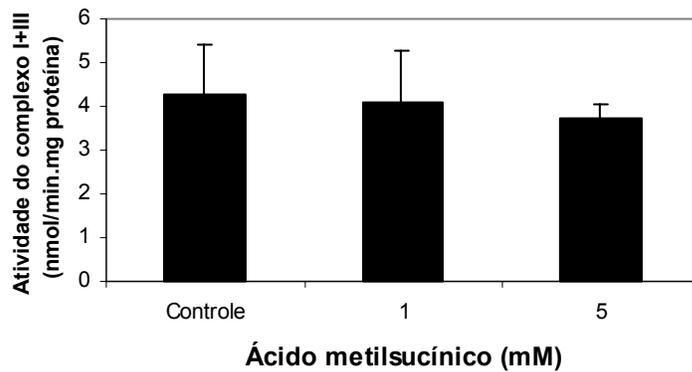


Figura 4.14 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo I+III em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.2.2 Succinato desidrogenase - SDH

As figuras 4.15 e 4.16 mostram o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade da succinato desidrogenase solúvel (SDH). Verifica-se que ambos os ácidos não alteraram a atividade da enzima na concentrações de 1 e 5 mM (ácido etilmalônico [F(2,12)= 0,051, p>0,05]; ácido metilsucínico [F(2,12)=0,383, p>0,05]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

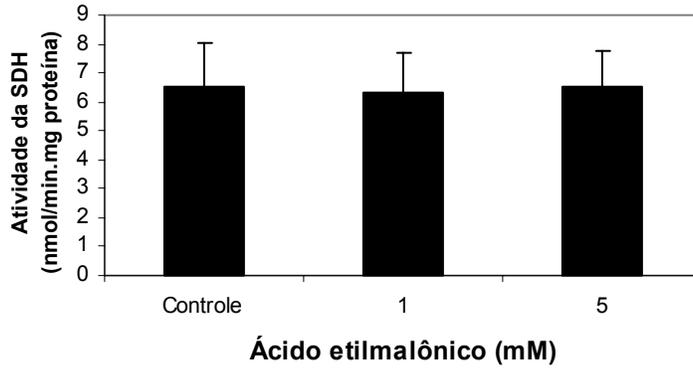


Figura 4.15 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade da SDH em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

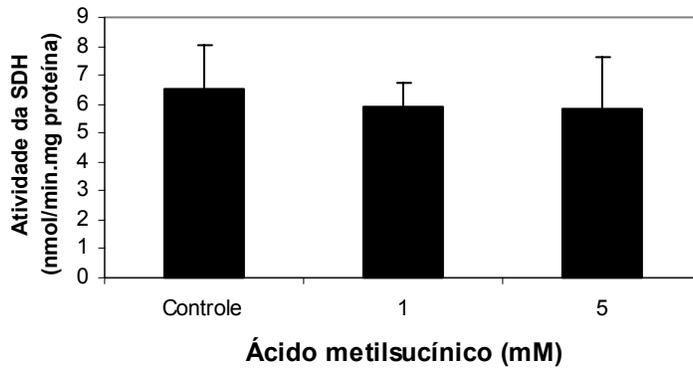


Figura 4.16 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade da SDH em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.2.3 Complexo II

O efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico também foi testado sobre a atividade do complexo II. As figuras 4.17 e 4.18 mostram que os ácidos não alteraram a atividade do complexo II nas concentrações de 1 e 5 mM (ácido etilmalônico [F(2,12)=0,387, p>0,05]; ácido metilsucínico [F(2,12)=0,823, p>0,05]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹.

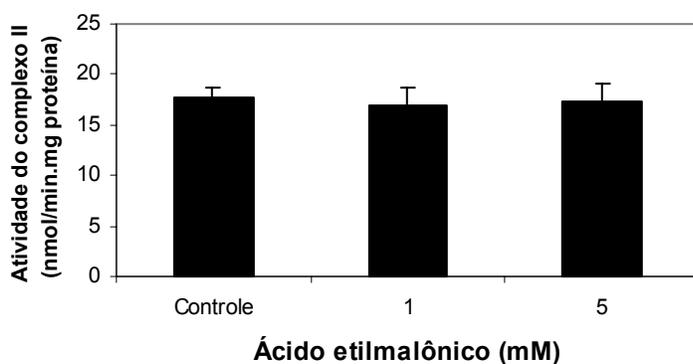


Figura 4.17 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo II em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

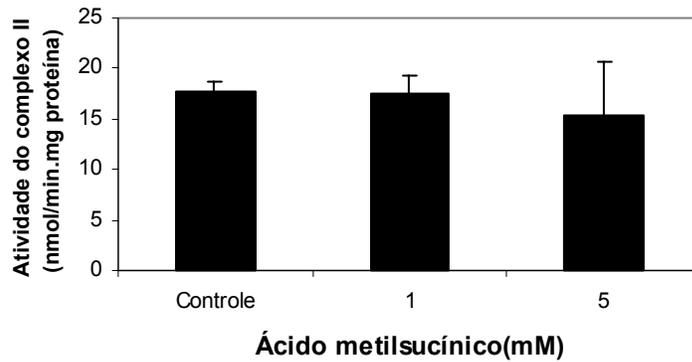


Figura 4.18 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo II em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.2.4 Complexo II + III

Também foi testado o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade do complexo II+III. Esses experimentos mostraram que tanto o ácido etilmalônico (figura 4.19) [F(2,12)=0,213, p>0,05] quanto o ácido metilsucínico (figura 4.20) [F(2,12)= 0,375, p>0,05] não alteraram a atividade do complexo nas concentrações de 1 e 5 mM. Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

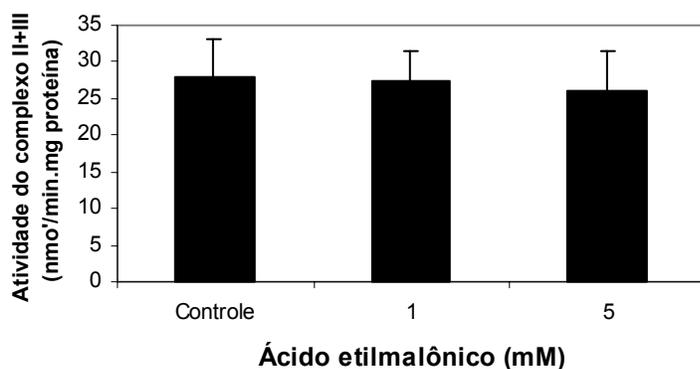


Figura 4.19 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo II+III em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

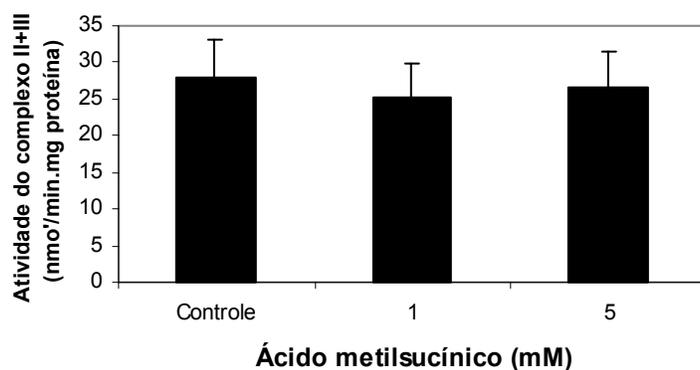


Figura 4.20 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo II+III em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.2.5 Complexo III

As figuras 4.21 e 4.22 mostram o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade do complexo III. Verifica-se que os ácidos não alteraram a atividade do complexo nas concentrações de 1 e 5 mM (ácido etilmalônico [F(2,9)= 0,916, $p>0,05$]; ácido metilsucínico [F(2,9)=0,143, $p>0,05$]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$.

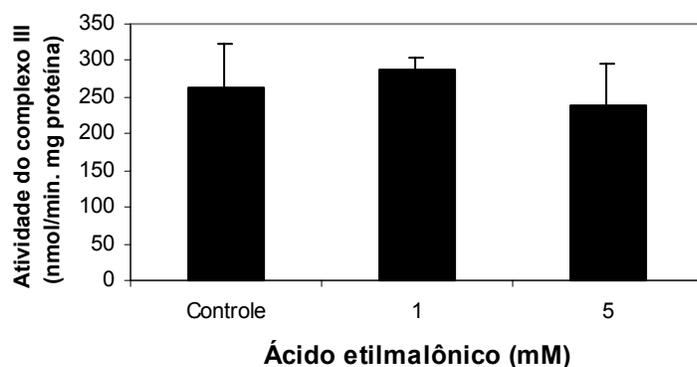


Figura 4.21 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo III em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

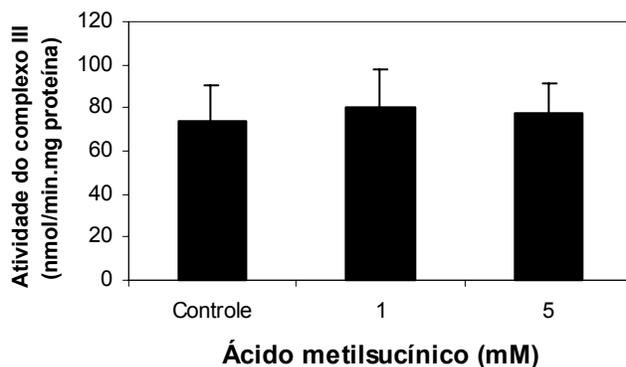


Figura 4.22 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo III em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.2.6 Complexo IV

O efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico foi testado também sobre a atividade do complexo IV. As figuras 4.23 e 4.24 mostram os resultados desses experimentos, expressos $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹. Verifica-se que os ácidos não afetaram a atividade do complexo IV nas concentrações de 1 e 5 mM (ácido etilmalônico [F(2,12)= 0,045, p>0,05]; ácido metilsucínico [F(2,12)=0,188, p>0,05]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

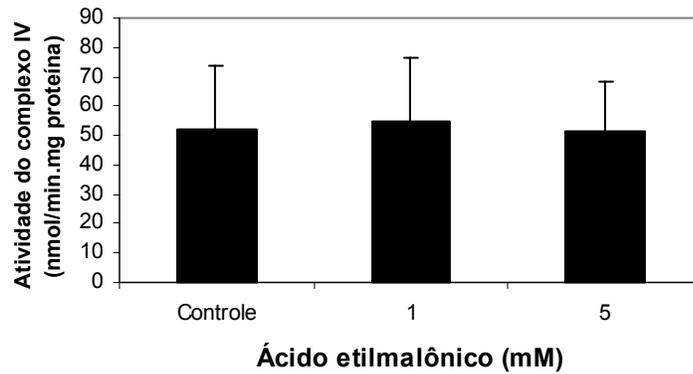


Figura 4.23 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo IV em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

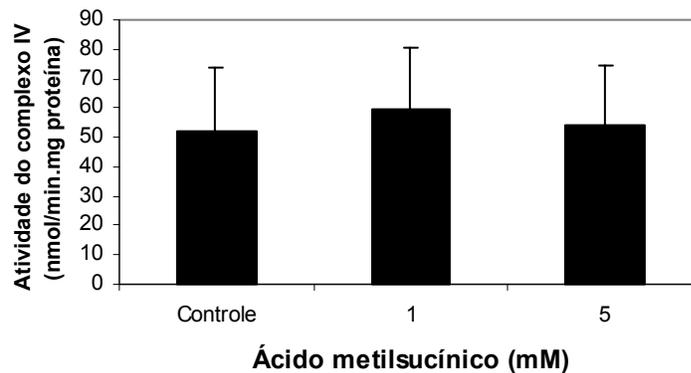


Figura 4.24 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo IV em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.3 Efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em músculo cardíaco de ratos

4.3.1 Complexo I+III

O efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico foi testado sobre a atividade do complexo I+III da cadeia respiratória em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. As figuras 4.25 e 4.26 mostram que os ácidos etilmalônico e metilsucínico não alteraram a atividade do complexo nas concentrações de 1 e 5 mM (ácido etilmalônico [F(2,9)= 0,277, p>0,05]; ácido metilsucínico [F(2,9)= 0,221, p>0,05]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹.

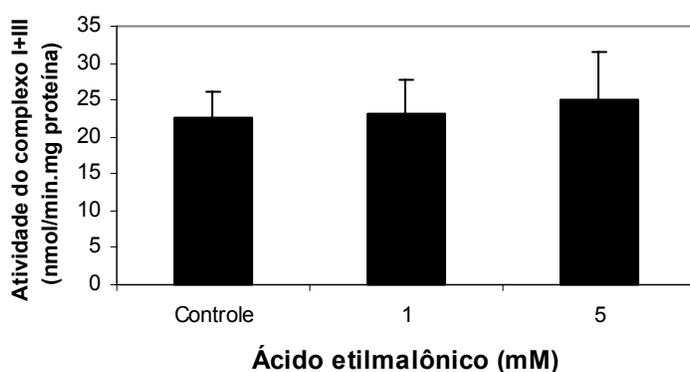


Figura 4.25 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo I+III em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

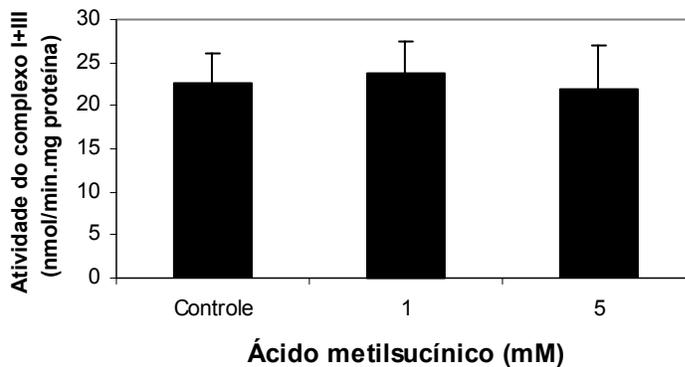


Figura 4.26 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo I+III em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.3.2 *Sucinato desidrogenase - SDH*

As figuras 4.27 e 4.28 mostram o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade da succinato desidrogenase solúvel (SDH). Verifica-se que ambos os ácidos não alteraram a atividade da enzima na concentrações de 1 e 5 mM (ácido etilmalônico [F(2,9)= 0,046, $p>0,05$]; ácido metilsucínico [F(2,9)= 0,118, $p>0,05$]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹.

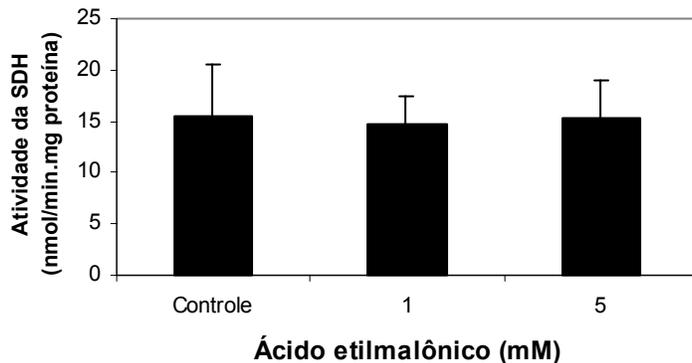


Figura 4.27 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade da SDH em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

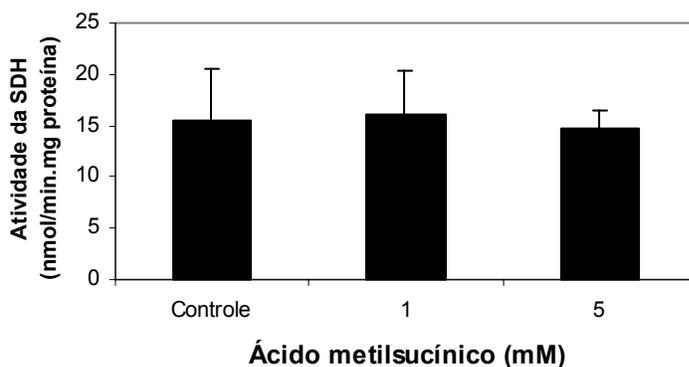


Figura 4.28 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade da SDH em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.3.3 Complexo II

O efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico também foi testado sobre a atividade do complexo II. As figuras 4.29 e 4.30 mostram que os ácidos não alteraram a atividade do complexo II nas concentrações de 1 e 5 mM (ácido etilmalônico [F(2,9)= 0,486, $p>0,05$]; ácido metilsucínico [F(2,9)= 1,100, $p>0,05$]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹.

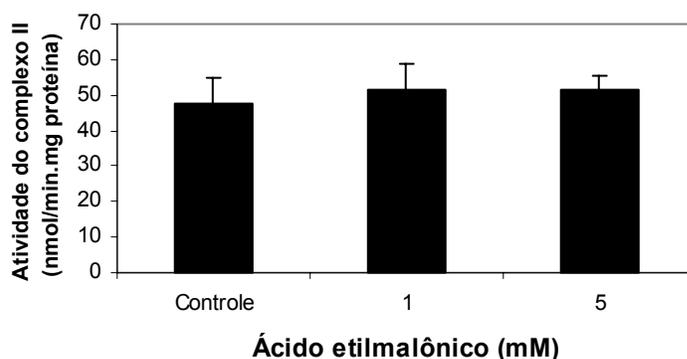


Figura 4.29 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo II em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

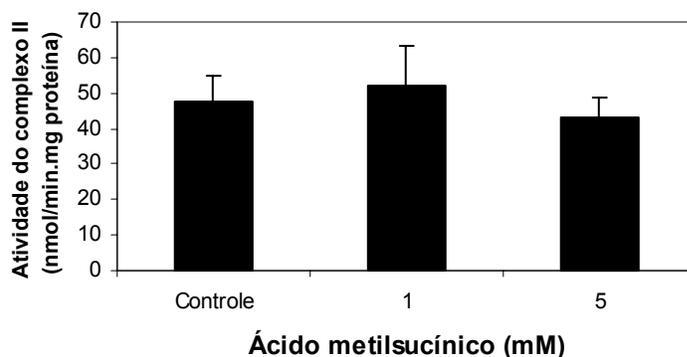


Figura 4.30 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo II em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.3.4 Complexo II + III

Também foi testado o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade do complexo II+III. Esses experimentos mostraram que tanto o ácido etilmalônico (figura 4.31) [F(2,9)= 0,131, $p>0,05$] quanto o ácido metilsucínico (figura 4.32) [F(2,9)= 0,185, $p>0,05$] não alteraram a atividade do complexo nas concentrações de 1 e 5 mM. Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

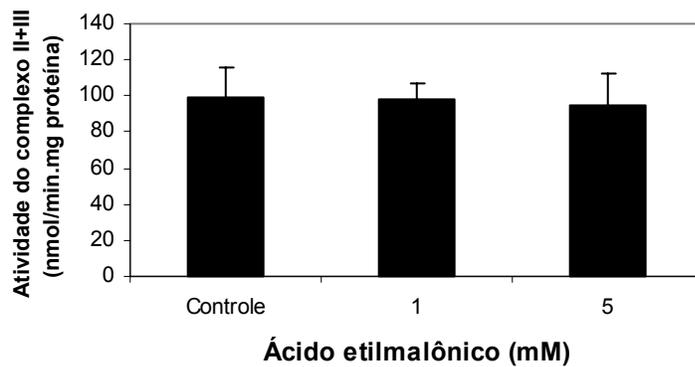


Figura 4.31 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo II+III em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

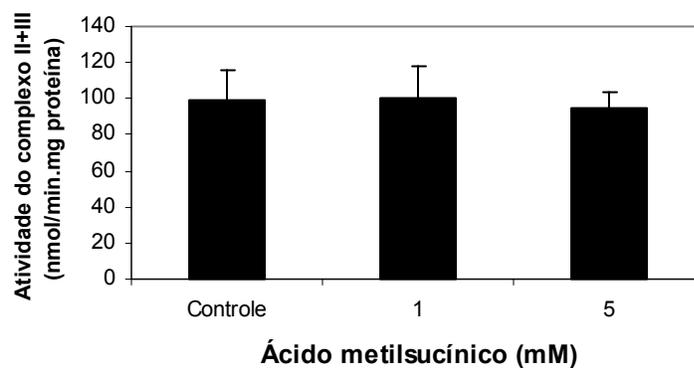


Figura 4.32 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo II+III em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.3.5 Complexo III

As figuras 4.33 e 4.34 mostram o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade do complexo III. Verifica-se que os ácidos não alteraram a atividade do complexo nas concentrações de 1 e 5 mM (ácido etilmalônico [F(2,9)= 0,063, $p>0,05$]; ácido metilsucínico [F(2,9)= 0,261, $p>0,05$]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$.

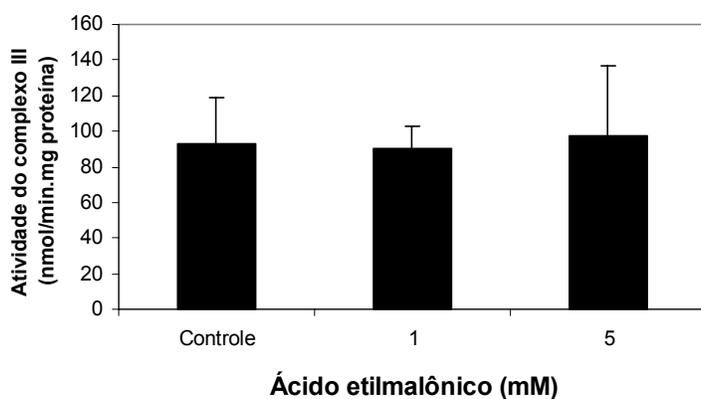


Figura 4.33 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo III em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão ($n=4$). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

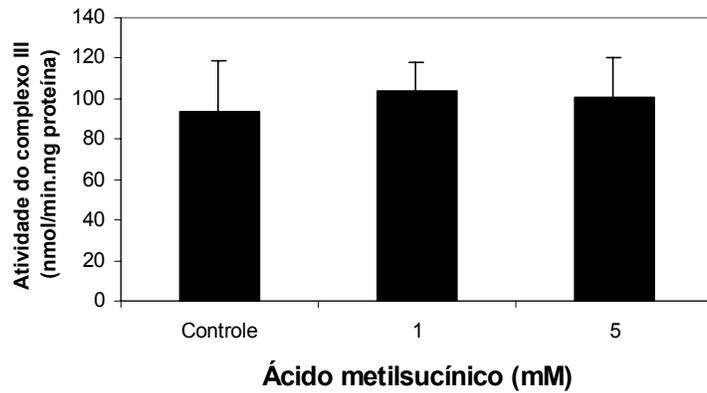


Figura 4.34 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo III em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.3.6 Complexo IV

O efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico foi testado também sobre a atividade do complexo IV. As figuras 4.35 e 4.36 mostram os resultados desses experimentos, expressos $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹. Verifica-se que os ácidos não afetaram a atividade do complexo IV nas concentrações de 1 e 5 mM (ácido etilmalônico [$F(2,9)= 0,008$, $p>0,05$]; ácido metilsucínico [$F(2,9)=1,940$, $p>0,05$]). Os resultados estão expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹.

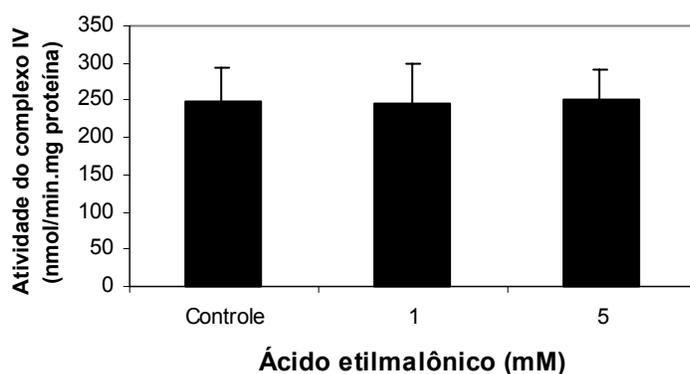


Figura 4.35 – Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade do complexo IV em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão ($n=4$). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

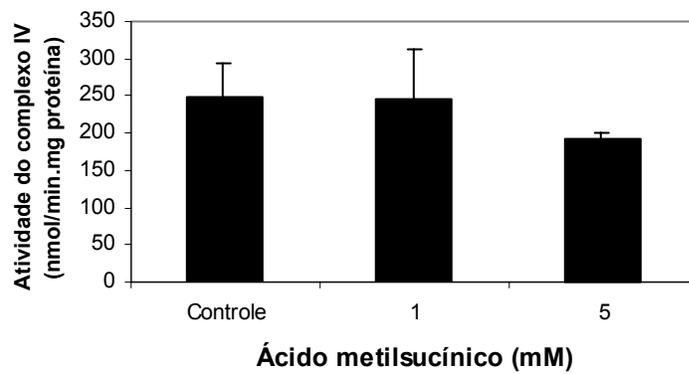


Figura 4.36 – Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade do complexo IV em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=4). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.4 Efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade da creatina quinase em córtex cerebral de ratos

Foi testado o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos. Esses experimentos mostraram que o ácido etilmalônico inibiu significativamente a atividade da creatina quinase nas concentrações 1,0 e 2,5 mM (figura 4.37) [F(3,12)=6,608. P<0,01], enquanto o ácido metilsucínico não alterou a atividade da enzima nas mesmas concentrações (figura 4.38) [F(3,19)=0,133, p>0,05]. Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol. creatina. min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$.

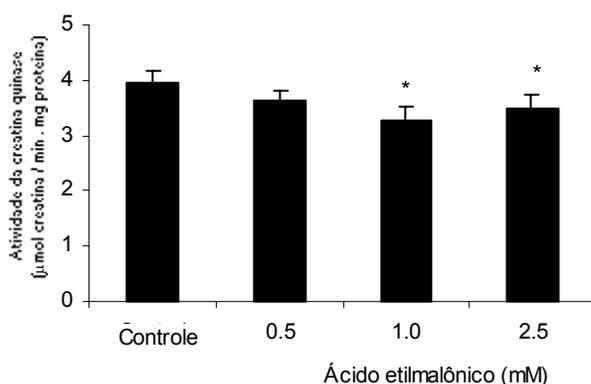


Figura 4.37 - Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de córtex de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

*P<0,05 em relação ao controle (ANOVA, seguido pelo teste de Duncan)

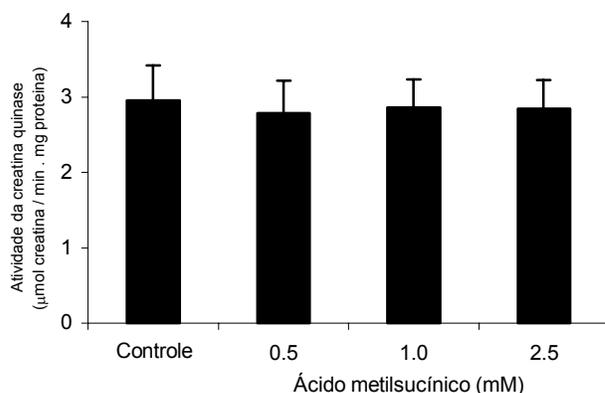


Figura 4.38 - Efeito *in vitro* do ácido metilsucínico sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de córtex de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em duplicata. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.5 Efeito do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase em córtex cerebral de ratos na presença de antioxidantes

Testou-se então se o efeito inibitório do ácido etilmalônico poderia ser devido à ação de radicais livres e/ou à oxidação de grupos sulfidríla fundamentais para a atividade da enzima, tendo em vista que a creatina quinase possui muitos resíduos cisteína. Para isso foi determinada a atividade da enzima na presença do ácido etilmalônico e do antioxidante glutathiona, dos seqüestradores de radicais livres trolox (vitamina E hidrossolúvel) e ácido ascórbico e do inibidor da óxido nítrico sintase L-NAME. As figuras 4.39 [F(5,29)=6,739, $p < 0,001$] e 4.40 [F(5,30)=9,534, $p < 0,0001$] mostram que o efeito inibitório do ácido etilmalônico (EMA) sobre a creatina quinase foi prevenido pela adição de 1 mM de glutathiona, enquanto a adição de 2 mM de ácido ascórbico, 10 μ M de trolox ou 1 mM de L-NAME não preveniram o efeito inibitório do ácido etilmalônico. Podemos também observar que a glutathiona, o trolox, o ácido ascórbico e o L-NAME *per se* não alteraram significativamente a atividade da enzima

creatina quinase. Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol. creatina. min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína⁻¹.

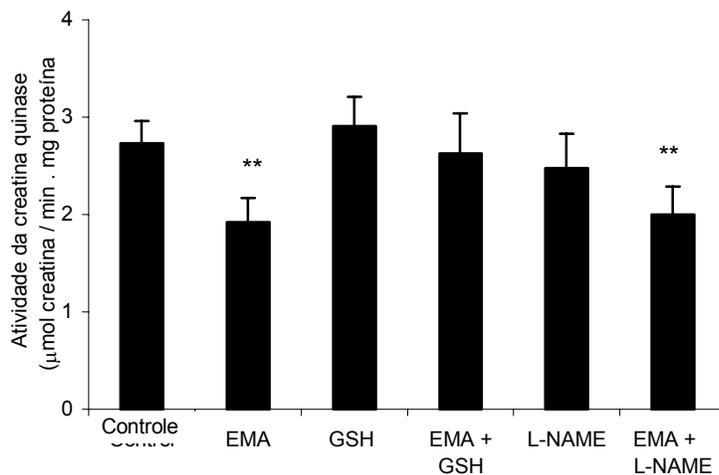


Figura 4.39 - Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (EMA) sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos em presença ou ausência da glutatona (GSH) e do L-NAME. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=6). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

*P<0,05, **p<0,01 em relação ao controle (ANOVA, seguido pelo teste de Duncan)

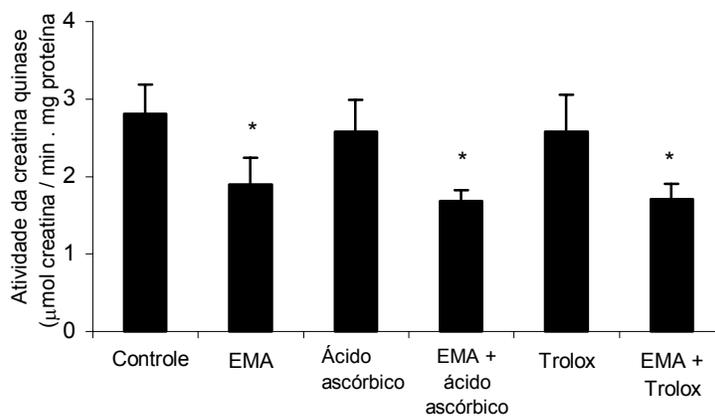


Figura 4.40 - Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (EMA) sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos em presença ou ausência do α -tocoferol (TROLOX) e do ácido ascórbico. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=6). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

*P<0,05 em relação ao controle (ANOVA, seguido pelo teste de Duncan)

4.6 Efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade da creatina quinase em músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos

Também foi testado o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos. As figuras 4.41 e 4.42 mostram que os dois metabólitos não alteraram a atividade da enzima em ambos tecidos, em concentrações que variaram entre 0,5 e 2,5 mM (músculo esquelético: ácido etilmalônico [$t(1,8)=0,426$, $p>0,05$], ácido metilsucínico [$F(3,19)=1,098$, $p>0,05$]; músculo cardíaco: ácido etilmalônico [$F(3,19)=0,182$, $p>0,05$], ácido metilsucínico [$F(3,19)=0,917$, $p>0,05$]). Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol. creatina. min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$.

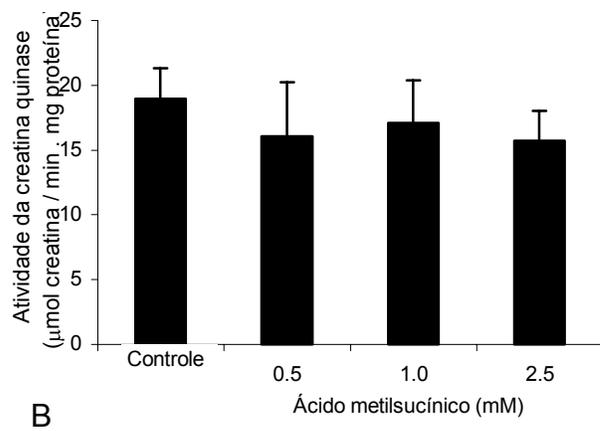
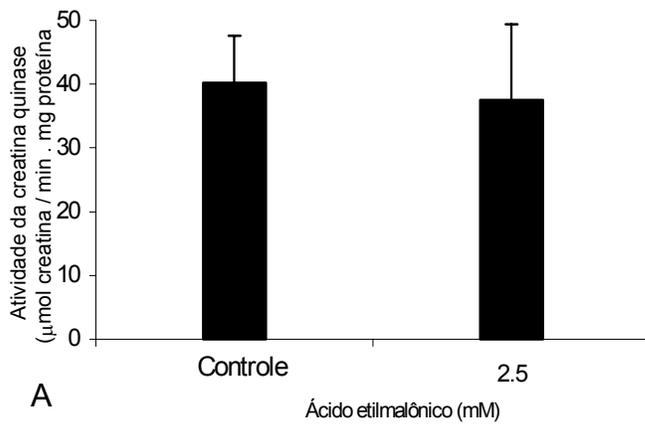
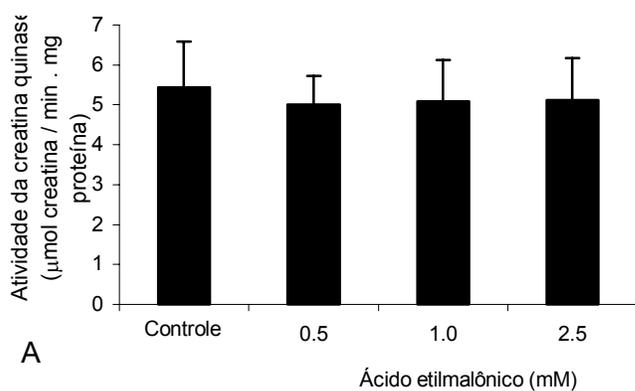
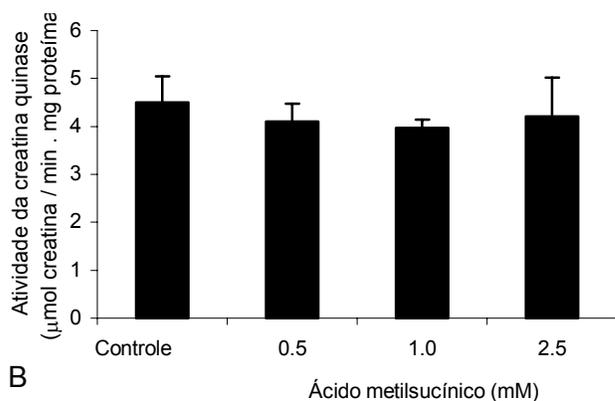


Figura 4.41 - Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (A) e do ácido metilsucínico (B) sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de músculo esquelético de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (Teste t de Student, para amostras pareadas (A) e ANOVA (B)).



A



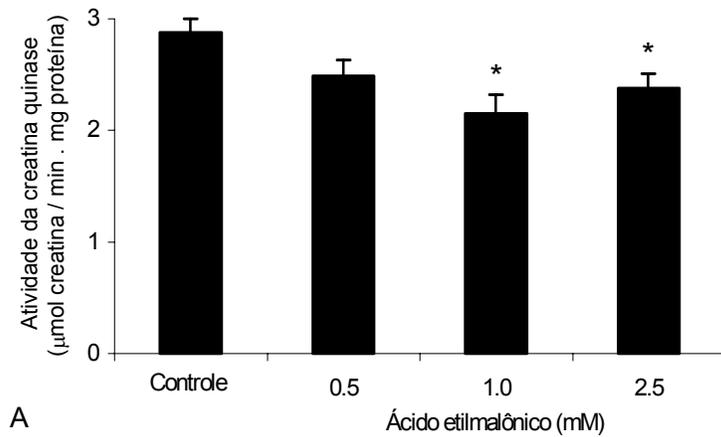
B

Figura 4.42 - Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (A) e do ácido metilsucínico (B) sobre a atividade da creatina quinase em homogeneizado de músculo cardíaco de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=5). Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

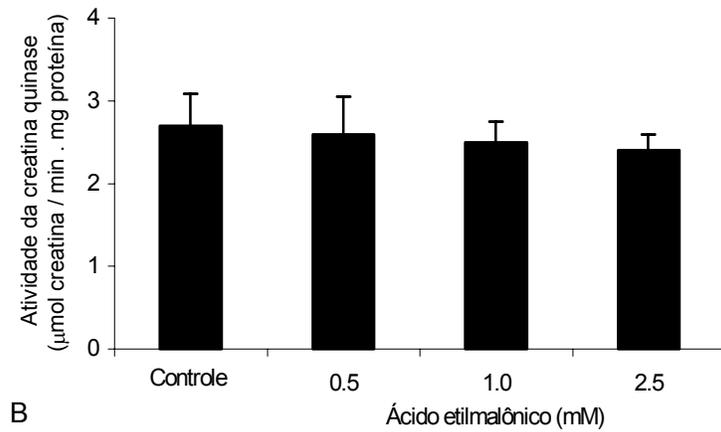
Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

4.7 Efeito do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de córtex cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos

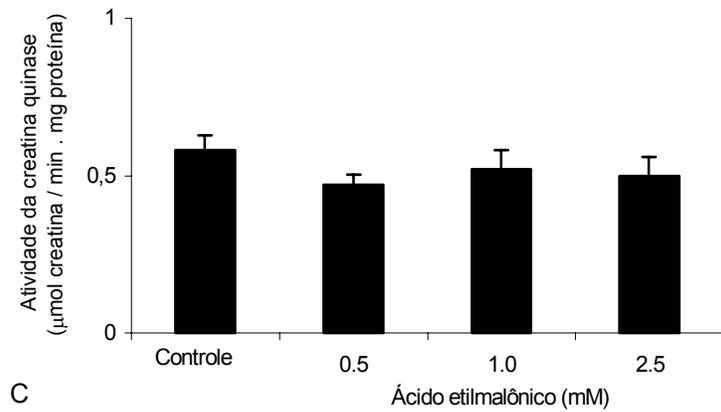
Foi também testado o efeito do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase em frações mitocondriais (CK_{mi}) de córtex cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos. A figura 4.43 (A) mostra que o ácido etilmalônico nas concentrações 1,0 e 2,5 mM inibiu significativamente a atividade da creatina quinase mitocondrial em córtex cerebral [$F(3,24)=4,567$, $p<0,05$]. No entanto, o ácido etilmalônico não alterou a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de músculo cardíaco [$F(3,16)=0,140$, $p>0,05$] e esquelético [$F(3,16)=0,864$, $p>0,05$], figuras 4.43 (B) e (C) o que já era esperado, já que a creatina quinase total não foi afetada pelo ácido nestes tecidos. Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol.creatina.min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$.



A



B



C

Figura 4.43 - Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de homogeneizado de córtex (A), músculo cardíaco (B) e músculo esquelético (C) de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão (n=6-8). Todos os experimentos foram feitos em duplicata. *p<0,05 em relação ao controle (ANOVA, seguido pelo teste de Duncan)

4.8 Efeito do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de córtex cerebral de ratos na presença de antioxidantes

Com objetivo de verificar se o efeito inibitório do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase mitocondrial poderia ser mediado pela ação de radicais livres ou relacionado a uma possível ação sobre grupamentos tiólicos da enzima, foi medida a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial na presença do ácido etilmalônico e do antioxidante glutathiona, e dos seqüestradores de radicais livres trolox e ácido ascórbico ou do inibidor da óxido nítrico sintase L-NAME. A figura 4.44 mostra que o efeito do ácido etilmalônico foi prevenido pela adição de 0,5 mM de glutathiona e de 0,5 mM de ácido ascórbico no meio de incubação, porém a adição de 1 mM de L-NAME e de 20 μ M de trolox não preveniram a ação inibitória do ácido [F(9,50)=3,152, $p < 0,05$]. Podemos também observar que a glutathiona, o trolox, o ácido ascórbico e o L-NAME *per se* não alteraram significativamente a atividade da enzima. Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol.creatina.min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$.

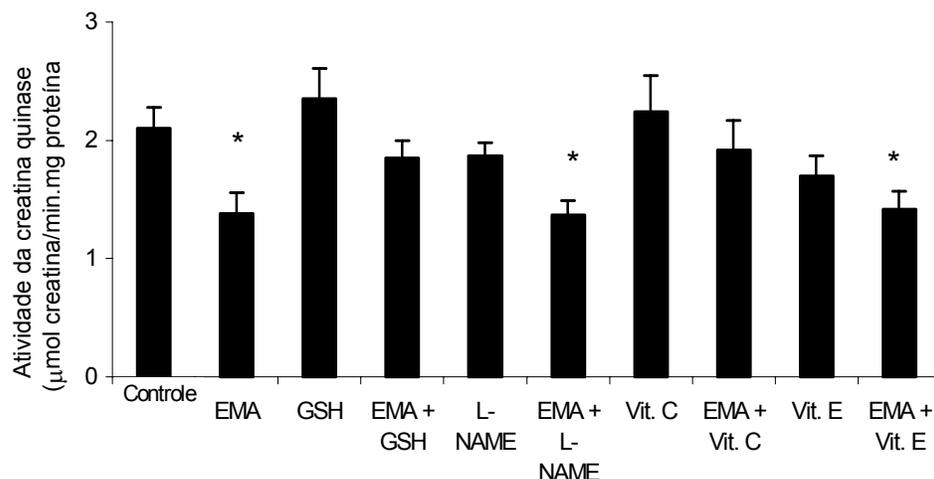


Figura 4.44 - Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico (EMA) sobre a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de homogeneizado de córtex cerebral de ratos em presença ou ausência da glutathiona (GSH), do L-NAME, α -tocoferol (Vit. E) e do ácido ascórbico (Vit. C). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão (n=6). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

*P<0,05 em relação ao controle (ANOVA, seguido pelo teste de Duncan)

4.9 Efeito do ácido etilmalônico sobre a atividade da fração citosólica da creatina quinase de córtex cerebral, músculo cardíaco e músculo esquelético de ratos

A seguir foi testado o efeito do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase em frações citosólicas de córtex cerebral, músculo cardíaco e músculo esquelético de ratos. Na figura 4.45 podemos observar que o ácido etilmalônico não afeta a atividade da enzima em nenhum dos três tecidos (córtex cerebral [F(3,20)=1,681, p>0,05]; músculo esquelético [F(3,16)=0,728, p>0,05];músculo cardíaco [F(3,20)=0,466, p>0,05]). Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol.creatina.min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína⁻¹.

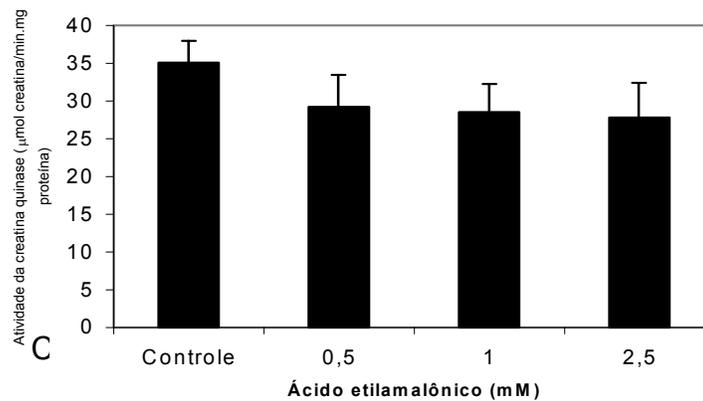
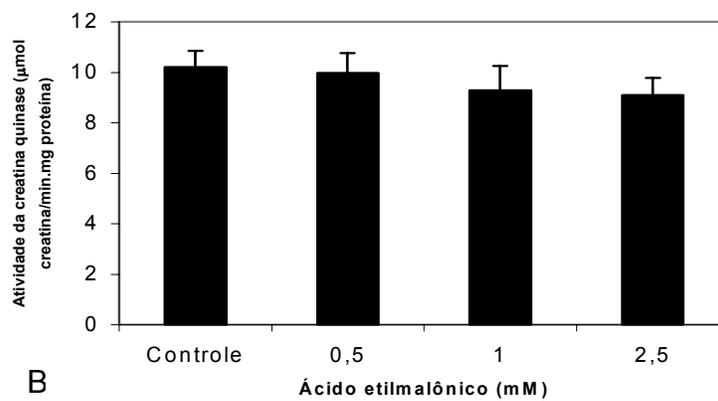
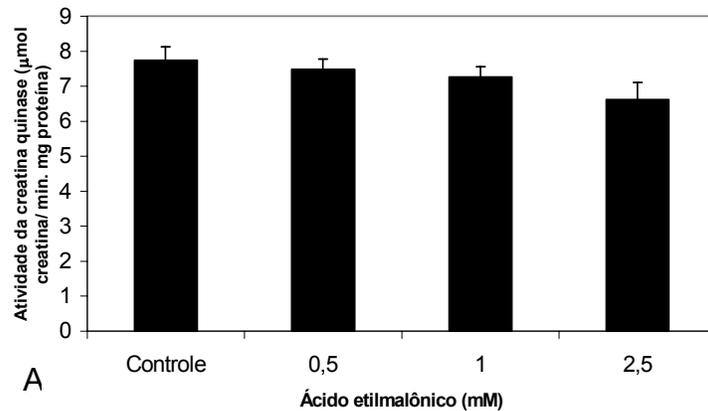


Figura 4.45 - Efeito *in vitro* do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase na fração citosólica de homogeneizado de córtex (A), músculo cardíaco (B) e músculo esquelético (C) de ratos. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=6-8). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as médias (ANOVA).

5. DISCUSSÃO

A elevação acentuada na concentração do ácido etilmalônico acompanhada de um aumento menor na concentração do ácido metilsucínico são achados característicos na deficiência de desidrogenase da acil-CoA de cadeia curta (SCAD). Outras doenças neurodegenerativas também apresentam aumento nas concentrações do ácido etilmalônico, como a síndrome da encefalopatia etilmalônica, a acidemia glutárica tipo II e alguns distúrbios neurodegenerativos cujo defeito bioquímico não está ainda definido (Roe & Ding, 2001; Burlina et al, 1994; Ozand et al, 1994).

Os sinais mais característicos apresentados pelos pacientes afetados por essas desordens são encefalopatia e miopatia, cuja patogênese não está ainda esclarecida. Essas doenças são potencialmente letais e em situações de crise aguda ou descompensação metabólica os pacientes apresentam-se mais profundamente afetados, manifestando usualmente coma e edema cerebral (Roe & Ding, 2001).

Os pacientes com deficiência de SCAD apresentam comumente acidose láctica, indicando uma provável disfunção mitocondrial que pode resultar em déficit no metabolismo energético.

O cérebro é um dos órgãos mais ativos metabolicamente. Ele utiliza como principal fonte de energia fundamentalmente a glicose, que através da via glicolítica, do ciclo de Krebs, da cadeia respiratória e da fosforilação oxidativa, forma a maior parte do ATP necessário às necessidades metabólicas cerebrais (Dickinson, 1996; Erecinska & Silver, 1994). Déficit de produção de energia, característica das mitocondriopatias, usualmente se manifesta como encefalopatia, miopatia ou encefalomiopatia (Shapira, 1999; Darras & Friedman, 2000) que correspondem a expressão fenotípica da deficiência de SCAD e de outras doenças com acúmulo de ácido etilmalônico.

Portanto, no presente trabalho estudamos o efeito *in vitro* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico, principais metabólitos acumulados na deficiência de SCAD e na encefalopatia etilmalônica, sobre algumas atividades enzimáticas essenciais ao metabolismo energético. Testamos o efeito desses metabólitos sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória e da creatina quinase em córtex cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos jovens. A manutenção dessas atividades é essencial para o funcionamento normal desses tecidos ricos em mitocôndrias e a redução dessas atividades pode causar dano a êles (Wyss et al, 1992; Stachowiak et al, 1998; Shapira, 1999).

Inicialmente estudamos o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre os complexos da cadeia respiratória. A cadeia respiratória tem uma participação bastante importante no metabolismo energético. É através dela que são bombeados prótons para o espaço intermembranas formado o gradiente eletroquímico que ativa a ATP sintase produzindo grande parte do ATP necessário às células.

Verificamos que tanto o ácido etilmalônico quanto o ácido metilsucínico inibiram significativamente a atividade do complexo I+III em córtex cerebral de ratos jovens, porém não alteraram a atividade dos demais complexos da cadeia respiratória (II, SDH, II+III, III e IV) nesse tecido bem como não alteraram a atividade de todos os complexos da cadeia respiratória em músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos jovens. Nesse particular, trabalhos recentes tem demonstrado que uma inibição da cadeia respiratória por metabólitos acumulados em vários distúrbios de oxidação de ácidos graxos, como por exemplo na deficiência de LCHAD, onde os metabólitos acumulados (ácidos dicarboxílicos e ácido 3-hidroxicarboxílico, com cadeias contendo entre 6 e 14 carbonos) reduzem significativamente a atividade de todos os complexos da cadeia

respiratória (Ventura et al, 1995; Woitezak & Schonfeld, 1993). Estudos mostraram também que derivados acil-CoA inibem a fosforilação oxidativa e a cadeia respiratória e que ácidos graxos e seus derivados apresentam um efeito semelhante aos detergentes sobre as biomembranas. A toxicidade dos ácidos graxos e seus derivados acil-CoA parece estar relacionada ao tamanho da cadeia de carbonos da molécula; quanto maior o número de átomos carbonos, maior e mais prejudicial será o efeito do ácido graxo e seus derivados (Das et al, 2000; Ventura et al, 1995). Tendo em vista assim, que os metabólitos acumulados na deficiência de SCAD possuem cadeia de carbonos curta, acreditamos que o efeito seletivo dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre o complexo I+III em córtex deve ocorrer por um outro mecanismo diferente daquele dos ácidos graxos de cadeia média ou longa que alteram a fluidez da membrana plasmática.

Após os resultados obtidos com os complexos da cadeia respiratória, resolvemos estudar o efeito dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre a atividade da creatina quinase, uma enzima fundamental para o metabolismo energético em tecidos ricos em mitocôndrias.

A creatina quinase tem um papel bastante importante no metabolismo energético tanto cerebral como muscular. O sistema creatina quinase/creatina/fosfocreatina é bastante importante para a manutenção dos níveis de energia, uma vez que ele regenera o ATP consumido nos tecidos e transfere o ATP dos sítios de produção para os sítios de consumo (Wyss et al., 1992; Boehm et al, 1996). A creatina quinase está presente principalmente nos tecidos com alta demanda de energia, como cérebro, músculo esquelético e músculo cardíaco. Nesses tecidos as diferentes isoformas da creatina quinase se distribuem de modo desigual. O cérebro possui predominantemente

a isoforma citosólica CK-BB e a isoforma mitocondrial CK_{mi} a, enquanto o músculo esquelético possui a isoforma citosólica CK-MM e a isoforma mitocondrial CK_{mi} b e o músculo cardíaco apresenta a isoforma citosólica CK-MB e a isoforma mitocondrial CK_{mi} b (O'Gorman, 1996; Wyss et al, 1992).

Verificamos que o ácido etilmalônico reduz de forma significativa a atividade total da creatina quinase em córtex cerebral, porém não altera essa atividade em músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos. Por outro lado, o ácido metilsucínico não modificou a atividade da creatina quinase em nenhum dos três tecidos, córtex cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco.

Esses resultados mostram que o ácido etilmalônico inibe de forma seletiva a creatina quinase cerebral, não alterando a atividade da enzima em outros tecidos. Tais resultados sugerem que o ácido etilmalônico atua de forma preponderante sobre as isoformas cerebrais da creatina quinase, ou seja, que o ácido atua especificamente sobre as isoformas CK-BB e/ou CK_{mi} a.

O próximo passo foi Investigar se o efeito inibitório do ácido etilmalônico sobre a creatina quinase em córtex cerebral poderia ser devido à ação de radicais livres e/ou à oxidação de grupos sulfidríla induzidos por esse ácido e fundamentais para a atividade dessa enzima. Estudos tem demonstrado a suscetibilidade da creatina quinase à agentes oxidantes. A enzima possui resíduos de cisteína contendo grupamentos tióis que podem ser alvo de agentes oxidantes como o óxido nítrico e outros radicais livres (Soboll et al, 1999; Konorev et al, 1998; Stachowiak et al, 1998). Resultados anteriores mostraram que o óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS) inibem a creatina quinase em músculo esquelético e músculo cardíaco (Mekhfi et al, 1996 ; Wolosker et

al, 1996), enquanto a creatina quinase mitocondrial cardíaca pode ser inativada pelo peroxinitrito (Stachowiak et al, 1998).

Verificamos que o antioxidante glutathiona, que atua como um agente redutor de grupos tióis *in vivo*, preveniu totalmente o efeito inibitório do ácido etilmalônico. Acredita-se, portanto que a inativação parcial da enzima pelo ácido etilmalônico possa ser mediada pela oxidação de grupos tióis ou outros grupamentos da enzima. Esses resultados vem ao encontro de outros estudos que mostraram que a inibição da creatina quinase mitocondrial cardíaca induzida por radicais livres pode ser revertida pelos agentes redutores ditiotreitól (Mekhfi et al, 1996) e 2-mercaptoetanol (Stachowiak et al, 1998), indicando assim o envolvimento de resíduos tióis no sítio ativo da enzima. Por outro lado, os seqüestradores de radicais peroxila trolox e o ácido ascórbico, que atuam sobre os radicais hidroxila e superóxido, e o inibidor da óxido nítrico sintase L-NAME não preveniram o efeito do ácido etilmalônico, sugerindo que, nas condições utilizadas em nossos ensaios, o ácido etilmalônico não induz a formação desses radicais livres e óxido nítrico

Estudamos também o efeito do ácido etilmalônico sobre as isoformas citosólica e mitocondrial da creatina quinase. Verificamos que o ácido etilmalônico não altera a atividade da creatina quinase tanto em preparações mitocondriais quanto em citosólicas em músculo esquelético e músculo cardíaco, o que já era esperado uma vez que o ácido não alterou a atividade total da creatina quinase nos mesmos tecidos. No entanto, o ácido etilmalônico inibiu a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial em córtex cerebral, mas não alterou a atividade da enzima na fração citosólica no mesmo tecido. Esses resultados indicam que o ácido etilmalônico possui um efeito inibitório específico sobre a isoforma mitocondrial da creatina quinase, ou seja, sobre a CK_{mi} a,

não afetando a isoenzima citosólica cerebral ou as isoenzimas citosólicas e mitocondrial presentes no músculo esquelético e no músculo cardíaco.

Investigamos também se o efeito do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase mitocondrial poderia ser mediado pela ação de radicais livres e/ou quanto estaria relacionado a uma possível ação sobre grupamentos tiólicos da enzima. Verificamos, então, que tanto a glutatona, quanto o ácido ascórbico, preveniram eficientemente o efeito inibitório do ácido etilmalônico sobre a fração mitocondrial da creatina quinase. O efeito da glutatona, que atua como um agente redutor de grupos tióis, indica que a ação inibitória do ácido etilmalônico sobre a creatina quinase mitocondrial pode estar relacionada a oxidação de grupos sulfidril essenciais à atividade da enzima. Já a prevenção do efeito inibitório do ácido etilmalônico causada pelo ácido ascórbico sugere que o ácido pode estar envolvido com a formação de radicais superóxido e hidroxila, uma vez que este agente oxidante atua sobre esses radicais livres. Por outro lado, o L-NAME e o trolox não apresentaram efeito sobre essa ação inibitória, indicando que o óxido nítrico ou seus derivados (p.ex. peroxinitrito) não são formados pelo ácido etilmalônico.

Nossos resultados, portanto, sugerem que o ácido etilmalônico possa prejudicar o metabolismo energético cerebral ao inibir o complexo I+III da cadeia respiratória e a enzima creatina quinase mitocondrial no cérebro, o que poderia estar relacionado com a encefalopatia característica dos pacientes onde este ácido está acumulado. É interessante observar-se que alterações mitocondriais podem ser observadas à microscopia em alguns pacientes com deficiência de SCAD, tendo alguns pacientes sido diagnosticados erroneamente como acidemia láctica congênita (Roe & Ding, 2001; Dawson, 1995). Nesse particular, a redução da atividade da creatina quinase tem sido

associada a vários distúrbios caracterizados por disfunção cerebral como a doença de Alzheimer e outros distúrbios neurodegenerativos (Shapira, 1999; Aksenov et al, 2000; David et al, 1998).

Acreditamos que nossos resultados possam contribuir, mesmo em parte, para elucidar a etnopatogenia da disfunção neurológica associada à deficiência de SCAD. Os pacientes apresentam um agravamento do quadro nos momentos de crise ou descompensação metabólica, quando os níveis do ácido etilmalônico aumentam drasticamente. Entretanto, nossos resultados não explicam a miopatia associada à fraqueza muscular apresentada por esses pacientes.

Concluindo, demonstramos que os ácidos etilmalônico e metilsucínico reduzem a atividade do complexo I+III. Consequentemente é provável que esses ácidos prejudiquem a síntese de ATP, visto que impedem a formação do gradiente eletroquímico, que depende da transferência seqüencial de elétrons entre todos os complexos da cadeia respiratória (Marks et al, 1996). Além disso o ácido etilmalônico inibe a atividade da enzima creatina quinase, possivelmente através da oxidação de grupos fundamentais da enzima. A creatina quinase tem papel importante na manutenção dos níveis energéticos no cérebro. Ela atua tanto como tampão energético, regenerando o ATP, como também como um transferidor de ATP dos sítios de produção para os de consumo (Wyss et al, 1992).

Nossos resultados são oriundos de experimentos *in vitro*. Seria interessante investigar o efeito desses ácido *in vivo*. Daí o desenvolvimento de um modelo experimental químico da acidúria etilmalônica através da injeção parenteral do ácido etilmalônico a ratos jovens parece ser uma perspectiva viável para se estudar o efeito *in*

vivo da administração dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre os parâmetros energéticos investigados no presente trabalho.

6. CONCLUSÕES

- Os ácidos etilmalônico e metilsucínico inibiram significativamente a atividade do complexo I+III da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos de 30 dias na concentração de 1 mM. Esses mesmos ácidos não alteraram a atividade dos complexos II, SDH, II+III, III e IV nesse tecido na concentração de 1 mM.
- Os ácidos etilmalônico e metilsucínico não alteraram a atividade dos complexos da cadeia respiratória I+III, II, SDH, II+III, III e IV em músculo esquelético de ratos nas concentrações de 1 e 5 mM.
- Os ácidos etilmalônico e metilsucínico não alteraram a atividade dos complexos da cadeia respiratória I+III, II, SDH, II+III, III e IV em músculo cardíaco de ratos nas concentrações de 1 e 5 mM.
- O ácido etilmalônico inibiu significativamente a atividade total da creatina quinase em córtex cerebral de ratos nas concentrações de 1 e 2,5 mM, enquanto o ácido metilsucínico não alterou a atividade da enzima nas mesmas concentrações.
- O efeito inibitório do ácido etilmalônico sobre a atividade total da creatina quinase em córtex cerebral foi prevenido pela adição de 1 mM do antioxidante glutathiona.
- A adição de ácido ascórbico (2mM), trolox (10 μ M) ou L-NAME (1 mM) não preveniu o efeito inibitório do ácido etilmalônico sobre a atividade total da creatina quinase em córtex cerebral.
- Os ácidos etilmalônico e metilsucínico não alteraram a atividade total da creatina quinase em músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos em concentrações de 0,5 a 2,5 mM.

- O ácido etilmalônico inibiu significativamente a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de córtex cerebral de ratos nas concentrações de 1 e 2,5 mM. No entanto, o ácido etilmalônico não alterou a atividade de creatina quinase na fração mitocondrial de músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos nas concentrações de 0,5 a 2,5 mM.
- A adição de glutatona (0,5 mM) e de ácido ascórbico (0,5 mM) preveniu o efeito inibitório do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de córtex cerebral.
- O efeito inibitório do ácido etilmalônico sobre a atividade da creatina quinase na fração mitocondrial de córtex cerebral não foi prevenido pela adição de L-NAME (1 mM) ou trolox (20 μ M).
- O ácido etilmalônico não alterou a atividade da creatina quinase na fração citosólica de córtex cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos nas concentrações de 0,5 a 2,5 mM.
- Os ácidos etilmalônico e metilsucínico comprometem o metabolismo energético cerebral através da inibição de atividades enzimáticas essenciais para a produção e transporte de energia pela célula.

7. PERSPECTIVAS

Pretendemos dar continuidade a este trabalho, investigando a ação *in vivo* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre vários parâmetros do metabolismo energético, bem como a ação dos mesmos sobre outros parâmetros.

1. Verificação da ação *in vitro* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre as atividades dos complexos da cadeia respiratória e da enzima creatina quinase em outras estruturas cerebrais (cerebelo, estriado e hipocampo).
2. Desenvolvimento de um modelo animal experimental de acidúria etilmalônica e de acidúria metilsucínica através de injeções subcutâneas dos ácidos etilmalônico e metilsucínico.
3. Ação *in vivo* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre os mesmos parâmetros do metabolismo energético verificados no presente trabalho, ou seja, sobre as atividades dos complexos da cadeia respiratória e da enzima creatina quinase em cérebro, músculo esquelético e músculo cardíaco.
4. Verificação do efeito *in vivo* dos ácidos etilmalônico e metilsucínico sobre os níveis de ATP, ADP, lactato e piruvato e suas relações em cérebro, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos.

8. BIBLIOGRAFIA

Abeles, R.H.; Frey, P.A.; Jenks, W.P. *Biochemistry*. London: Jones and Barlett, 1992.

Aksenov, M., Aksenova M., Butterfield, A. D., Markesbery, W. R. (2000): Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem*, 74: 2520-2527.

Bhala, A.; Willi, S.M.; Rinaldo, P. et. al. (1995): Clinical and biochemical characterization of short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Pediatr*, 126(6): 910-915.

Birch-Machin, M.A., Briggs, H.L., Saborido, A.A., Bindoff, L.A. & Turnbull, D.M. (1994): An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. *Biochem Med Metab Biol*, 51: 35-42.

Boehm, E.A.; Radda, G.K.; Tomlin, H. and Clark, J.F. (1996): The utilisation of creatine and analogues by cytosolic and mitochondrial creatine kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1274: 119-128.

Buchanan, D.N. and Thoene, H.G. Volatile Organic Acid Profiling in Physiological Fluids Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry In: Hommes, F.A *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics*. 1st ed. , New York, Wiley-Liss Inc., 1991 P. 133-141.

Burlina, A.B.; Dionisi-Vinci, C.; Bennett, M.J. et. al. (1994): A new syndrome with ethylmalonic aciduria and normal fatty acid oxidation in fibroblasts. *J Pediatr*, 124: 79-86.

Burton, B.K. (1987): Inborn Errors of Metabolism: the clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics*, 79:359.

- Chalmers RA, Purkiss P, Watts RWE, Lawson AM. (1980): Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. *J Inher Metab Dis*, 3: 27-29.
- Chalmers, R.A, Lawson, A M. *Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias*, 1st ed., London, Chapman and Hall, 1982.
- Corydon, M. J., Gregersen, N., Lehnert, W., et al. (1996): Ethylmalonic aciduria is associated with an amino acid variant of short chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *Pediatr Res*, 39:1059-1066.
- Das, A.M; Fingerhut, R.; Wanders, R.J.A.; Ullrich, K. (2000): Secondary respiratory chain defect in a boy with long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: possible diagnostic pitfalls. *Eur J Pediatr*, 159: 243-246.
- Darras, B.T and Friedman, N.R. (2000): Metabolic myopathies: a clinical approach; part I. *Pediatr Neurol*, 22: 87-97.
- David, S. S., Shoemaker, M. and Haley, B. E. (1998): Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: correlation of reduced enzyme activity and active site photolabelling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Mol Brain Res*, 54: 276-287.
- Dawson, D.B.; Waber, L.; Hale, D.E. et. al. (1995): Transient organic aciduria and lacticacidemia in a patient with short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Pediatr*, 126(1): 69-71.
- Dickinson, C.J. (1996): Cerebral oxidative metabolism in hypertension. *Clinical Science*, 91: 539-550.
- Eaton, S., Bartlett, K. And Pourfarzam, M. (1996): Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem J*, 320: 345-357.

- Erecinska, M. and Silver, I.A. (1994): Ions and energy in mammalian brain. *Progress in Neurobiology*, 43: 37-71.
- Ersser, R.S. And Smith, I. Aminoacids and Related Compounds In: Smith, I. and Seakins, I.W.T. *Chromatographic and Eletrophoretic Techniques*. 4st ed London, William Heinemann Medical Books Ltd, 1976.
- Fischer, J.C.; Ruitenberek, W.; Berden, J.A. et. al. (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chem Acta*, 153: 23-26.
- García-Silva, M.T.; Ribes, A.; Campos, Y.; Garavaglia, B. and Arenas, J. (1997): Syndrome of encephalopathy, petechiae and ethylmalonic aciduria. *Pediatr Neurol*, 17: 165-170.
- Golpertz, D. (1974): Inborn Errors of Organic Acid Metabolism. *Clin Endocrinol Metab*, 3: 107.
- Hoffmann, G Organic Acid Analysis. In Blau., N., Duran, M., Blaskovics, M.E. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Disease*, 1st ed., London, Chapman and Hall, 1996. P.31-49.
- Hoffmann, G.F. (1994): Selective screening for inborn errors of metabolism – past, present and future. *Eur J Pediatr*, 153 (Suppl. 1): S2-S8.
- Hughes, B. P. (1962): A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta*, 7:597-604.
- Joseph, M.H. And Marsden, C.A Amino Acids and Small Peptides In: Lim, C.K. *HPLC of Small Molecules*. 1st ed, Oxford, IRL Press, 1986. P13-28.

- Konorev, E.A.; Hogg, N. and Kalyanaraman, B. (1998): Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxyinitrite. *FEBS Letters*, 427(2): 171-174.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-75.
- Marks, D.B., Marks, A.D., Smith, C.M. Basic Medical Biochemistry: a clinical approach (1996).
- Mekhfi, H., Veksler, V., Mateo, P., Maupoil, V., Rochette, L., and Ventura- Clapier, R. (1996): Creatine kinase is the main target of reactive oxygen species in cardiac myofibrils. *Circ Res*, 78:1016-1027
- O'Gorman, E.; Beutner, G.; Wallimann, T. and Brdiczka, D. (1996): Differential effects of creatine depletion on the regulation of enzyme activities and on creatine-stimulated mitochondrial respiration in skeletal muscle, heart and brain. *Biochim Biophys Acta*, 1276: 161-170.
- Oyedotun, K.S.; Lemire, B. D. (1999): The *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase anchor subunit, SDH4p: mutations at the C-terminal Lys-132 perturb the hydrophobic domain. *Bioch Bioph Acta*, 1411: 170-179.
- Ozand, P.T.; Rashed, M.; Millington, D.S. et. al. (1994): Ethylmalonic aciduria: an organic acidemia with CNS involvement and vasculopathy. *Brain Development*, 16(suppl): 12-22.
- Rashed, M., Ozand, P.T., Aqeel, A, Gascon, G.G. (1994): Experience of King Faisal Specialist Hospital and Research Center with organic acid disorders. *Brain Develop*, 16 (Suppl): 1-6.

- Ribes, A.; Riudor, E.; Garavaglia, B. et al. (1998): Mild or absent clinical signs in twin sisters with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Eur J Pediatr*, 157: 317-320.
- Rinaldo, P. (2001): Fatty acid transport and mitochondrial oxidation disorders. *Seminars in Liver Diseases*, 21 (4): 489-499.
- Rinaldo, P., Rayond, K., Al-Odaib, A, Bennett, M.J. (1998): Clinical and biochemical features of fatty acid oxidation disorders. *Current Opinion in Pediatrics*, 10: 615-621.
- Roe, C.R.; Ding J. Mitochondrial fatty acids oxidation disorders. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*, 8th edn. New York: McGraw-Hill, Inc., 2001.
- Roe, R.E., Coates, P.M. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders, In: Scriver, C.R., Beaudet, A L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*, 7th ed., New York, McGraw-Hill, Inc., 1995.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., et al. (1994): Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chem Acta*, 228: 35-51.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.
- Sewell, A.C.; Herwing, J.; Böhles, H. et. al. (1993): A new case of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency with isolated ethylmalonic aciduria. *Eur J Pediatr*, 152: 922-924.
- Shapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D. et al (1990): Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 54: 823-827.
- Shapira, A.H.V. (1999): Mitochondrial disorders. *Biochim Biophys Acta*, 1410: 99-102.

- Sinclair, L.A. (1982) A new look at the inborn errors of metabolism. *Ann Clin Biochem*, 19: 314-21.
- Soboll, S.; Brdiczka, D.; Jahnke, D. et. al. (1999): Octamer-dimer transitions of mitochondrial creatine kinase in heart disease. *J Moll Cell Cardiol*, 31(4): 857-866.
- Sokoloff, L. (1993): Sites and mechanisms of function-related changes in energy metabolism in the nervous system. *Dev Neurosci*, 15: 194-206.
- Sorensen, R.G. & Mehler, H.R. (1982): Localization of endogenous ATPases at nerve terminal. *J Bioenerg Biomembr*, 14: 527-547.
- Stachowiak, O.; Dolder, M.; Wallimann, T. and Richter, C. (1998): Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. *J Biol Chem*, 273(27): 16694-16699.
- Sweetman, L; Williams, J.C. Branched chain organic acidurias. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*, 8th edn. New York: McGraw-Hill, Inc., 2001.
- Sweetmann, L. Organic acid analysis. In: Hommes, FA (Ed.) *Techniques in diagnostic human biochemical genetics. A laboratory manual*. 1^a ed. New York: Wiley-Liss; 1995. P. 143-176.
- Tanaka, K.; Budd, M.A.; Efron, M.L., Isselbacher (1966): Isovalericacidemia :a new genetic defect of leucine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 56: 236-239.
- Tein, I.; Haslam, R.H.A.; Rhead, W.J. et. al. (1999): Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cause of ophthalmoplegia and multicore myopathy. *Neurology*, 52(2): 366-372.

Ventura, F.V.; Ruiten, J.P.; Ijlst, L et al. Inhibition of oxidative phosphorylation by palmitoyl-CoA in digitonin permeabilized fibroblasts: implications for long-chain fatty acids beta-oxidation disorders. *Biochim Biophys Acta*, 1272: 14-20, 1995.

Warrs, R.W.E.; Chalmers, R.A.; Lawson, A.M. Abnormal organic acidurias in mentally retarded patients. *Lancet*, 1:368, 1975.

Woitezak, L; Schonfeld, P. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1183: 41-57, 1993.

Wolosker, H, Panizzutti, R., and Englender, S. 1996 Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. *FEBS Letters*, 392(3):274-276.

Wyss, M.; Smeitink, J; Wevers, R.A. and Wallimann, T. (1992): Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1102: 119-166.